

# **Auswirkungen einer transkoronaren Applikation autologer Knochenmarkstammzellen auf Hämodynamik und Zellmigration im Ischämie-Reperfusions-Modell am Langendorff-Herzen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von Konrad Vollmer

geboren am 18.09.1979 in Dresden

angefertigt am Herzzentrum Leipzig, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität  
Leipzig, Klinik für Herzchirurgie

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Co-Betreuer: Prof. Dr. med. Jens Garbade

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 14.11.2017

*Vom Kleinsten zum Größten, vom Jüngsten zum Ältesten sei diese  
Arbeit all jenen gewidmet, deren Wirken mich zu dem gemacht hat,  
der ich bin.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	4
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	5
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	6
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	8
1.1.	Übersicht Herzinsuffizienz	8
1.2.	Regenerativer Therapieansatz	9
1.2.1.	Verwendete Stammzellarten	10
1.2.2.	Stammzellvermittelte Mechanismen myokardialer Regeneration	11
1.2.3.	Klinische Studienlage	14
1.2.4.	Art der Stammzellapplikation im Rahmen klinischer Studien	16
1.2.5.	Zeitpunkt der Stammzellapplikation	17
1.2.6.	Mechanismen der Transmigration mononukleärer Zellen	18
1.2.7.	Connexin43 und BMC	18
1.2.8.	NF- $\kappa$ B (nuclear factor - kappa B)	19
1.3.	Aufgabenstellung	21
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	23
2.1.	Material	23
2.1.1.	Versuchstiere	23
2.1.2.	Technische Ausrüstung	23
2.1.3.	Software	25
2.1.4.	Chemikalien und Medikamente	25
2.1.5.	Immunhistologie	26
2.1.6.	Waschpuffer und Antigenretrieval-Lösungen	27
2.2.	Methoden	28
2.2.1.	Langendorff-Versuch und BMC-Isolation	28
2.2.1.1.	Aufbau der Langendorff-Versuchsapparatur	28
2.2.1.2.	Erfassbare Parameter während des Langendorff-Versuches	29
2.2.1.2.1.	Druck-Zeit-Kurven	29
2.2.1.2.2.	Koronarer Fluss (CF)	30
2.2.1.2.3.	Registrierung extrazellulärer Potentiale ("EKG")	30
2.2.1.3.	Präparation der Kaninchenherzen	30
2.2.1.4.	Isolation von Knochenmarkstammzellen (BMC)	31
2.2.1.5.	Durchführung des Langendorff-Versuches	32
2.2.1.6.	Bestimmung von Anzahl und Retention der BMCs	33

2.2.2. Histologie .....	33
2.2.2.1. Fixierung der Kaninchenherzen .....	33
2.2.2.2. Paraffineinbettung.....	34
2.2.2.3. Erstellen von histologischen Schnitten und Entparaffinierung.....	35
2.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) .....	35
2.2.2.5. Immunhistologie .....	36
2.2.2.5.1. Grundlagen der Immunhistologie .....	36
2.2.2.5.2. Färbemethoden, Detektionssysteme (nach Bönisch und Henne 2003)....	36
2.2.2.5.3. Doppel- und Mehrfachfärbungen.....	38
2.2.2.5.4. Antigendemaskierung .....	39
2.2.2.5.5. Reduktion von Hintergrundfärbung .....	39
2.2.2.5.6. Antikörper/-verdünnungen und verwendete Protokolle .....	39
2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie .....	41
2.2.4. Bestimmung von Zellzahl und -verteilung c-kit+ BMC und c-kit+/Cx43+ BMC .....	42
2.2.5. Hochrechnung der Anzahl retinierter c-kit+ BMC durch Bestimmung der mittleren Zelldichte und Approximation des Myokardvolumens .....	43
2.2.6. Erfassen aller c-kit+/NF- $\kappa$ B+ Zellen sowie Bestimmung des Anteils NF- $\kappa$ B- positiver Zellkerne im ischämischen und nicht-ischämischen linken Ventrikel.	44
2.2.7. Statistische Auswertung.....	44
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1. Einfluss von Ischämie und Stammzellinfusion auf die myokardiale Funktion .....	45
3.1.1. Entwickelter linksventrikulärer Druck.....	46
3.1.2. Rate pressure product.....	46
3.1.3. Koronarer Fluss.....	47
3.1.4. Relativer Koronarfluss .....	49
3.1.5. EKG-Mapping.....	49
3.2. Auswertung Zellzählung .....	50
3.2.1. Retention der infundierten BMC während des Langendorff-Versuches .....	50
3.2.2. Histologische Wiederfindungsrate der infundierten c-kit+ BMC.....	50
3.2.3. Räumlichkeitsverteilung der transplantierten c-kit+ BMC im ischämischen und nichtischämischen linksventrikulären sowie rechtsventrikulären Myokard	51
3.2.4. Extravasale vs. intravasale Zellverteilung .....	52
3.3. Connexin43-positive BMC .....	53
3.4. NF- $\kappa$ B-positive BMC .....	53
3.5. NF- $\kappa$ B-positive myokardiale Zellen .....	54
3.6. Anzahl c-kit+ und c-fos+ Zellen.....	55

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1. Einfluss der Stammzellinfusion auf rhythmogene Stabilität und Hämodynamik in der frühen Reperfusionphase.....	56
4.2. Aktivierung früher Gene im ischämischen Myokard .....	60
4.3. Ist bei unselektiver transkoronarer Applikation eine quantitativ adäquate Retention c-kit-positiver BMC möglich? .....	61
4.4. Verteilung der c-kit+ BMC im ischämischen und nicht-ischämischen Myokard sowie Hinweise auf Extravasation als Ausdruck eines Homing-Verhaltens .....	63
4.5. Lässt sich Connexin43 an c-kit+ BMC nachweisen? Ist ein elektrischer Kontakt zwischen BMC und Myokard nachweisbar? Werden in BMC und in ihrem direkten Umfeld "early genes" aktiviert? .....	66
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>92</b>
<b>Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....</b>	<b>93</b>

# I      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1	Übersicht über die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Pathophysiologie der Sepsis.....	21
Abbildung 2.1	Druckkonstantes System nach Langendorff .....	29
Abbildung 2.2	Druck-Zeit-Kurve .....	30
Abbildung 2.3	Versuchsablauf <i>IschämieBMC</i> .....	32
Abbildung 2.4a	Versuchsablauf <i>KontrolleIschämie</i> .....	33
Abbildung 2.4b	Versuchsablauf <i>KontrollePerfusion</i> .....	33
Abbildung 2.5	Schematische Darstellung eines Kaninchenherzens .....	34
Abbildung 2.6	Indirekte Methode .....	36
Abbildung 2.7	TSA-Methode Schritt 3 und 4 .....	38
Abbildung 2.8	HE-gefärbter Gewebeschnitt .....	42
Abbildung 3.1	Entwickelter linksventrikulärer Druck (dLVP) .....	46
Abbildung 3.2	Rate pressure product (RPP) .....	47
Abbildung 3.3	Koronarfluss (CF) .....	48
Abbildung 3.4	Koronarfluss (CF) in Abhängigkeit von der Anzahl infundierter BMC .....	48
Abbildung 3.5	Relativer Koronarfluss (relCF) .....	50
Abbildung 3.6	Anzahl c-kit+ BMC pro Gesichtsfeld incl. Verteilungsmuster extra- und intravasal .....	52
Abbildung 3.7	Beispiel für extravasal liegende c-kit+Zelle .....	52
Abbildung 3.8	c-kit+ BMC mit cytoplasmatischem Cx43+ Signal .....	53
Abbildung 3.9	c-kit+/Cx43-Zelle mit benachbarter c-kit-/Cx43+ Zelle .....	53
Abbildung 3.10	NF- $\kappa$ B in c-kit-neg. Zelle .....	54
Abbildung 3.11	Anteil NF- $\kappa$ B-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld .....	55

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Übersicht über verwendete Zelltypen mit Angabe der zugehörigen Studien/Quellen .....	11
Tabelle 1.2	Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt .....	15
Tabelle 1.3	Stammzelltherapie bei chronisch-ischämischer Herzkrankheit .....	16
Tabelle 2.1	Liste gebräuchlicher konjugierter Enzyme und deren Chromogene .....	37
Tabelle 3.1	Mittelwerte der gemessenen hämodynamischen und abgeleiteten Parameter der Versuchsreihe .....	46
Tabelle 3.2	Retention der infundierten BMC im Langendorff-Versuch .....	50
Tabelle 3.3	Histologische Wiederfindungsrate c-kit+ BMC .....	51

### III Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BCL	Herzzykluslänge (basic cycle length)
BMC	Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cell
BM-HSC	Bone-Marrow-Derived Haematopoietic Stem Cell
BM-MNC	Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cell
BM-MSC	Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CCM	Kardiale Kontraktilitätsmodulation
CCS	Cardiac Canadian Society (Klasse)
CDC	Cardiosphere-Derived Cell
CF	Koronarfluß
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cIMP	Zyklische Inosin-Monophosphatase
CMP	Kardiomyopathie
CPC	zirkulierende Progenitorzelle
CRT	Kardiale Resynchronisationstherapie
CSA	Catalized Signal Amplification
CT	Computertomographie
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
d.h.	das heißt
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
dLVP	entwickelter linksventrikulärer Druck
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDP	enddiastolischer Druck
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
et al.	et alii
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
GFP	Green Fluorescent Protein
GJIC	Gap Junction Intercellular Communication
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
HFpEF	Heart Failure with preserved Ejection Fraction
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval oder Heat Mediated Antigen Retrieval
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICMP	Ischämische Kardiomyopathie
IGF-1	Insulin-Like-Growth Factor 1
KM	Knochenmark
KT	Kühlschranktemperatur



LV-Angio	Linksventrikuläre Angiographie (Laevokardiographie)
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
min	Minute(n)
MNC	Mononuclear Cell
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor -kappa B
NT-proBNP	n-terminales BNP-Fragment
NYHA	New York Heart Association (Klasse)
PB-MNC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCI	Percutane Intervention
PKC	Proteinkinase C
RPP	Rate pressure product
RIVA	Ramus interventricularis anterior
ROS	Reactive Oxygene Species
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SEM	standard error of mean
SPC	Side-Population-Cell
STEMI	ST-Hebungs-Infarkt
TB-4	Thymosin beta-4
TBS	Tris Buffered Saline
TNF-alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNT	Tris-HCl, NaCl, Tween-Puffer
TSA	Tyramide Signal Amplification
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1. Einleitung

## 1.1. Übersicht Herzinsuffizienz

Das Herz und seine Erkrankungen nehmen zentrale Rollen im Leben und in der Medizin ein. Die chronisch ischämische Herzkrankheit (8,2%), der akute Myokardinfarkt (5,8%) und die Herzinsuffizienz (5,1%, 45815 Fälle) belegen die ersten drei Ränge der Todesursachenstatistik in Deutschland im Jahre 2013 (Statistisches Bundesamt 2014). Der nach der Geburt zweithäufigste Grund für die Aufnahme in ein Krankenhaus ist die Herzinsuffizienz (396380 Fälle). Herzrhythmusstörungen (280977) und Myokardinfarkt (221013) folgen auf den Rängen 4 und 12 (Fallzahlen jeweils für 2013, Bundesamt für Statistik 2014). Neben Hospitalisierungsrate und Mortalität besitzt die Herzinsuffizienz einen nicht zu unterschätzenden Krankheitswert - die Prävalenz wird in Deutschland auf ca. 1,8 Millionen Erkrankte geschätzt (Zugck 2013) - sowohl im gesundheitsökonomischen als auch im individuellen Kontext: Patienten leiden an der Einschränkung der alltäglichen Lebensqualität, es kommt zu Arbeitsunfähigkeit und psychische Folgeerkrankungen treten nicht selten auf.

Die Genese der Herzinsuffizienz als klinisches Syndrom wird dabei grob in zwei Gruppen unterteilt: diejenige mit erhaltener linksventrikulärer Funktion (*heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF*) und die mit eingeschränkter systolischer linksventrikulärer Funktion (*heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF*). Erstere ist durch eine diastolische Dysfunktion gekennzeichnet und besitzt eine mit dem Alter steigende Inzidenz (ca. 50% bei Hospitalisierten >70Jahre). Die Herzinsuffizienz bei eingeschränkter systolischer LV-Funktion als die klassische Form der Herzinsuffizienz ist vor allem ischämisch bedingt (*ischämische Kardiomyopathie, ICMP*, 49%), seltener durch eine dilatative (DCM, 28%), hypertensive (10%) oder valvuläre Kardiomyopathie (Tribouilloy et al. 2008).

Der Therapie der chronisch ischämischen Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarktes kommt daher eine zentrale Rolle in der Verhinderung der Herzinsuffizienz zu. Mit den Fortschritten der interventionellen Kardiologie und Bypasschirurgie in den letzten zwei Jahrzehnten konnte die Mortalität des akuten Myokardinfarktes erheblich reduziert werden. Dennoch führt auch dies zu einer insgesamt zunehmenden Inzidenz von *HFrEF* ischämischer Genese. Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz erfolgt vor allem medikamentös, wenngleich zahlreiche interventionelle Maßnahmen wie kardiale Resynchronisationstherapie (*CRT*; McMurray et al. 2012), kardiale Kontraktilitätsmodulation (*CCM*) oder auch Barorezeptor- und Vagusnervstimulation (Abraham WT 2013) bereits im klinischen Alltag Einzug gehalten

haben. Nur am Rande erwähnt seien die, in ihrer Anwendung jedoch zeitlich limitierten, mechanischen linksventrikulären Assist-Devices bei terminaler Herzinsuffizienz sowie die ultima-ratio-Therapie der Herztransplantation.

## 1.2. Regenerativer Therapieansatz

Mit dem Ende des letzten Jahrtausends ist auch die regenerative Medizin zunehmend in den Fokus der Therapie kardialer Erkrankungen gerückt: Das menschliche Herz galt historisch stets als terminal differenziertes, postmitotisches Organ ohne Fähigkeit zur Regeneration. Im Jahr 1998 konnte Kajstura jedoch zeigen, dass auf niedrigem Niveau eine permanente Proliferation von Kardiomyozyten stattfindet und diese bei terminaler Herzinsuffizienz bis auf das zehnfache ansteigt (Kajstura 1998). Auch nach Herzinfarkt konnte eine gesteigerte Myozytenproliferation nachgewiesen werden (Beltrami 2001). Ebenso finden sich in der Fachliteratur immer wieder Fallberichte über die ausgeprägte regeneratorsche Fähigkeit neonataler Menschenherzen nach Myokardinfarkt. So berichteten Haubner et al. von einem Neugeborenen mit schwerem Myokardinfarkt, dessen Herzfunktion sich nach initialer Revaskularisierung innerhalb weniger Wochen wieder vollständig normalisierte (Haubner et al. 2016).

Im Myokard konnten bisher mehrere Zellen mit der Fähigkeit zur Differenzierung in Kardiomyozyten (z.T. aber auch in Endothel- und glatte Muskelzellen) nachgewiesen werden:

- kardiovaskuläre Progenitor-Zellen (Isl-1+) (Laugwitz et al. 2005)
- kardiale Sca-1+ Stammzellen (Oh et al. 2003)
- kardiale Lin-/ckit+ Stammzellen (Beltrami et al. 2003)
- kardiale side-population cells (SP Cells) (Martin et al. 2004)
- c-kit+/CD34+/Sca1+ Cardiospheres (CS) (Messina et al. 2004)

Andererseits waren in mehreren Untersuchungen an Autoptaten von Männern, die das Herz eines weiblichen Donors erhalten hatten, Myozyten und Endothelzellen mit männlichem Chromosomensatz nachweisbar, d.h. es war hier zu einem kardialen Chimärismus durch Einwanderung extrakardialer (Vorläufer-)zellen des Organrezipienten gekommen (Quaini 2002, Laflamme 2002, Hocht-Zeisenberg 2004). Somit rückte der Ansatz, dass die Transmi-

gration extrakardialer Stammzellen die myokardiale Regeneration entscheidend beeinflussen könnten, in den Focus des wissenschaftlichen Interesses.

### 1.2.1. Verwendete Stammzellarten

Regenerative Therapien werden in der Hämatologie seit langem mit der Stammzelltransplantation erfolgreich angewendet, auch in der Dermatologie und beim tissue-engineering, z.B. bei der "Produktion" biologischer Herzklappen, ist der klinische Einsatz nahe. Das größte Differenzierungspotential liegt hierbei sicherlich bei den embryonalen Stammzellen - deren Einsatz ist jedoch aus ethischen Gründen limitiert und soll in dieser Diskussion nicht weiter verfolgt werden. Analog zur hämatologischen Stammzelltherapie liegt somit der Einsatz von adulten Knochenmarkstammzellen, kurz BMC (oder BMMNC - *bone-marrow-derived mononuclear cells*), nahe, da diese einfach und routiniert aus dem Knochenmark gewonnen werden können. Es sind autologe und allogene Transplantationen möglich. BMC sind eine heterogene Gruppe von Zellen, die allesamt die Fähigkeit besitzen zu proliferieren, zu transmigrieren und sich in verschiedene reife Zelltypen zu differenzieren. Zu ihnen werden die mesenchymalen Stammzellen (MSC), hämatopoetischen Stammzellen (HSC), endotheliale Progenitorzellen (EPC) und die sogenannten side-population-Zellen (SPC) gezählt (Strauer und Steinhoff 2011). HSC machen 2-4%, MSC <0,1% und SPC noch weniger der Gesamtpopulation der BMC aus, der Rest sind weiter differenzierte Zellen der Hämatopoese (Dimmeler und Zeiher 2009). MSC besitzen die Fähigkeit, sich in Zellen des mesodermalen Gewebes (Adipozyten, Chondrozyten, Myoblasten, Osteoblasten) zu differenzieren (Friedenstein 1976 u.a.). Anfang des Jahrtausends konnten Toma et al. am adulten Mausmodell zeigen, dass MSC in einen myokardialen Phänotyp differenzieren können (Toma et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden in der Folgezeit publiziert (Xu et al. 2004). HSCs bilden die Grundlage für die Differenzierung aller hämatopoetischer Zellen und sind durch ihre Oberflächenmarker (u.a. c-kit) charakterisier- und isolierbar. Balsam und Robbins führen in einem Übersichtsartikel aus, dass „zahlreiche Studien vermuten ließen, dass unfraktionierte Knochenmarkzellen bzw. mit HSC-angereicherte Knochenmarkzellen zur Bildung von verschiedenen nicht-hämatopoetischen Geweben beitragen könnten" (Balsam und Robbins, „Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart“, *Clinical Science* (2005) 109, S. 485). Orlic et al. konnten am Mausmodell nach Injektion  $\text{lin}^-/\text{c-kit}^+$  HSC in periinfarzielles Myokard eine Differenzierung dieser HSC hin zu Connexin43-exprimierenden Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachweisen (Orlic et al. 2001 a). Zudem berichtete Orlic in einer weiteren Publi-

kation, dass die Mobilisation von Stammzellen (nach Stimulation mit SCF und G-CSF stieg die Konzentration der c-kit<sup>+</sup> HSC im peripheren Blut auf das 250-fache) nach Myokardinfarkt in vivo zu einer Abnahme der 27-Tage Mortalität um 68% sowie zur Reduktion der Infarktgröße um 40% geführt hätte (Orlic et al. 2001 b).

Die Frage, welche Subpopulation von Knochenmarkstammzellen für die myokardiale Regeneration am besten geeignet ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Im klinischen Setting hat es sich daher etabliert, die ganze Gruppe mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark zu verwenden (BMC oder BM-MNC – fälschlicherweise in der Literatur auch oft als (BM)-MSC betitelt). Dies wird in zahlreichen in **Tab. 1.1** aufgeführten klinischen Studien so durchgeführt. Vereinzelt werden aus dem peripheren Blut isolierte MNC verwendet (Schächinger 2004).

embryonale Stammzellen	Ethische Beschränkungen
fetale Kardiomyozyten	
neonatale Kardiomyozyten	
adulte Kardiomyozyten	im Tiermodell getestet; für Menschen nicht leicht erhältlich
Knochenmarkzellen <ul style="list-style-type: none"> <li>- ganzes Knochenmark</li> <li>- BMC (BM-MNC)</li> <li>- HSC-angereichertes KM</li> <li>- MSC</li> <li>- endotheliale Progenitorzellen</li> </ul>	s. <b>Tab. 1.2</b> Orlic 2001, Balsam 2004, Rota 2007, Khan 2010 Toma 2002, Xu 2004 Schuster 2004, Urbich 2005
PB-MNC	Schächinger (TOPCARE-AMI) 2004
endotheliale Zellen	Condorelli 2001
glatte Muskelzellen	Li RK 1999
skelettale Myoblasten	Agbulut 2004
residente kardiale Stammzellen	Oskouei 2012, Bolli 2011

**Tab. 1.1** Übersicht über verwendete Zelltypen mit Angabe der zugehörigen Studien/Quellen

### 1.2.2. Stammzellvermittelte Mechanismen myokardialer Regeneration

Die primäre Überlegung beim Einsatz von Stammzellen lag darin, dass diese sich in die verlorenen Zelltypen differenzieren würden. Orlic et al. zeigten am Mausmodell nach Injektion lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> HSC in die Periinfarktzone, dass sich diese nach 9 Tagen zu Kardiomyozyten,

Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenziert hatten (Orlic 2001a). Jackson et al. konnten nach KM-Transplantation von lacZ-exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen in letal bestrahlten Mäusen nach transients Myokardischämie von den Spenderzellen abstammende Endothelzellen in Gefäßen der Periinfarktzone nachweisen (Jackson et al. 2001). Im Jahr 2007 konnten Rota et al. in einem *in vivo*-Modell an der Maus zeigen, dass c-kit-angereicherte BMC in der Lage sind, im infarzierten Herzen unter Ausbildung von Kardiomyozyten und Endothelzellen de-novo Myokard zu bilden (Rota et al. 2007). Für MSC konnten u.a. Toma (2002, *in Maus*), Xu (2004, *in vitro*) und Shake (2002, *in Schwein*) nach Myokardischämie und lokaler Implantation von MSC eine Differenzierung zu Zellen mit kardiomyogenetischen Eigenschaften nachweisen.

Demgegenüber steht eine Forscherfraktion, die genau dies nicht nachweisen konnte: Balsam et al. konnten mit einem ähnlichen Ansatz wie Orlic eben keine Differenzierung in kardiale Zellen nachweisen - hier entwickelten nach 30 Tagen die implantierten HSC Merkmale reifer hämatopoetischer Zellen. Allerdings fanden sich bei funktionellen Untersuchungen sowohl ein schützender Effekt gegen ventrikuläres Remodelling als auch eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Balsam et al. 2004). Zu ähnlichen negativen Ergebnissen in Hinblick auf Transdifferenzierung der HSC gelangten u.a. Nygren et al. (2004), Merry et al. (2004) und Norol et al. (2007). Ähnliches wiesen die Arbeitsgruppen um Siegel und Rose für MSC nach (Siegel et al. 2012; Rose et al. 2008). Im Ischämie-Modell konnten Iso et al. an Mäusen nach i.v.-Applikation von GFP-markierten humanen MSC zwar eine signifikante Verbesserung funktioneller Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, allerdings waren nach 3 Wochen keine der applizierten MSC mehr intrakardial nachweisbar (Iso et al. 2007).

Auch den endothelialen Progenitorzellen (EPC) wird eine positive Rolle bei myokardialer Regeneration zugesprochen. So konnte nachgewiesen werden, dass sich diese nach Ischämie in neu formierte Kapillaren integrierten, die Neovaskularisation generell förderten und nach Ischämie die kardiale Funktion verbesserten (Asahara et al. 1999). Urbich et al. (2005) zeigten, dass hierbei zusätzliche parakrine Effekte über die Sezernierung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren (VEGF, SDF-1 und IGF-1) zur Migration reifer Endothelzellen und sessiler kardialer Progenitorzellen in das ischämische Areal beitragen.

Betrachtet man die große Masse an *in-vivo*-Untersuchungen zur Stammzelltherapie am ischämischen Herzen, so findet sich eine starke Divergenz in den Ergebnissen in Bezug die dauerhafte Nachweisbarkeit der applizierten Zellen. Unter Berücksichtigung methodischer

Aspekte muss letztlich davon ausgegangen werden, dass nicht die Implantation oder Transdifferenzierung der applizierten Zellen, sondern in erster Linie parakrine Effekte für die nachweisliche Verbesserung funktioneller kardialer Parameter nach Stammzelltherapie verantwortlich sind (Menasché 2015): Ähnlich den EPC sezernieren MSC eine große Zahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die das lokale Immunsystem supprimieren, Fibrosierung und Apoptose inhibieren, die Angiogenese fördern sowie die Mitose und Differenzierung lokaler Reparatur- und anderer Stammzellen stimulieren. Diese Effekte wurden an verschiedenen geschädigten Geweben (z.B. nach Herz- und Hirninfarkt sowie bei Meniskusküsläsionen) nachgewiesen (Caplan und Dennis 2006). Gneccchi et al. zeigten an Akt-überexprimierenden MSC im Infarktmodell eine funktionelle Verbesserung nach MSC-Implantation innerhalb <72 Stunden, was aufgrund des kurzen Zeitfensters in erster Linie parakrine Effekte nahelegte. Sie konnten eine signifikante Hochregulation von Genen für protektive Faktoren (VEGF, FGF-2, HGF, IGF-I und TB-4) nachweisen (Gneccchi et al. 2006). Der kardioprotektive Effekt der MSC wird möglicherweise in erster Linie durch die Sezernierung von 50-100nm großen Komplexen, die als Exosome bezeichnet werden, verursacht. Nach Isolation solcher Exosome und Anwendung dieser in einem Ischämie-Reperusionsmodell am Langendorff-Herz konnte man eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nachweisen (Lai et al. 2010). Gestützt wird die parakrine Hypothese von dem Ergebnis einer Studie, die den Effekt von Cardiospheres allo-, xeno- und syngenesischen Ursprunges untersuchte. Dabei war die Zellretention nach 8 Tagen in der syn- und allogenen Gruppe identisch. Nach 3 Wochen war die Zellretention der syngenesischen Gruppen nach wie vor hoch, in der allogenen Gruppe waren aber alle Zellen verschwunden. Nach 6 Monaten waren jedoch die funktionellen Verbesserungen in beiden Gruppen identisch, woraus geschlossen wurde, dass die gute Zellretention der ersten drei Wochen ausreichte, um protektive Effekte in Gang zu setzen, ohne dass eine dauerhafte Zellimplantation erforderlich gewesen wäre (Malliaras et al. 2012).

Ein weiterer möglicher Effekt auf myokardialer Seite könnte die Hochregulation von Betarezeptoren durch BMC sein. So konnte am nicht-ischämischen Kardiomyopathie-Modell *in vivo* gezeigt werden, dass nach linksventrikulärer Injektion von BMC die Betaadrenorezeptordichte geringer abnahm als in der Kontrollgruppe, und korrelierend die myokardiale Kontraktilität zunahm (Dhein et al. 2006). Diese Zunahme der Betaadrenorezeptordichte konnte auch *in vitro* in einer BMC-Kardiomyozyten-Co-Kultur nach 3 Tagen bestätigt werden. Ursächlich hierfür war eine Aktivierung von c-myc und seiner Down-Stream-Targets, der Zell-Zyklus-Proteine CDK2, CDK4 und ATF-3 (Roeske et al. 2011).

### 1.2.3. Klinische Studienlage

Die Anzahl klinischer Studien ist hoch, übersichtsweise sind Studien zur Anwendung von Stammzellen nach akutem Myokardinfarkt (**Tab. 1.2**) und bei chronischer ischämischer Kardiomyopathie (**Tab. 1.3**) aufgeführt. Generell lässt sich hier ein Trend zur Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und Reduktion der Infarktgröße ablesen. Eine in 2015 publizierte Metaanalyse von 31 Studien mit 1521 Patienten konnte einen klaren Vorteil der Stammzelltherapie in Hinblick auf Belastbarkeit, linksventrikuläre Ejektionsfraktion und Lebensqualität zeigen (Fisher et al. 2015 a). Eine Cochrane-Analyse von 11 unabhängigen systematischen Reviews, die sowohl den Einsatz nach akutem Myokardinfarkt als auch bei chronischer ischämischer CMP einschlossen, konnte eine signifikante Verbesserung der LVEF von 2,6% - 5,6% zeigen (Harvey et al. 2015). Bei Betrachtung einer Subgruppe für Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt ließ sich allerdings eine tendenzielle Verbesserung der LVEF nur bei echokardiographischer Messung (2-5%), jedoch nicht bei Bestimmung im MRT nachweisen (Fisher et al. 2015 b).

Wie bereits erwähnt, ist man in Unkenntnis der optimalen Zellart im Rahmen der klinischen Studien häufig zum Einsatz einer heterogenen Zellpopulation aus dem Knochenmark übergegangen. Die Zellzahlen bewegen sich meist zwischen ca.  $20 \times 10^6$  und  $30 \times 10^7$  Zellen.



Erstautor / Studie	n	Zeitpunkt nach AMI	Applizierte Zellart	Zellzahl	Ergebnisse	Methode
Strauer (2002)	20 1:1 vs. Kontrolle	7-9 Tage	BMC i.c.	$28 \times 10^6$	EF +9% Infarktgröße -60%	LV-Angio
TOPCARE-AMI (Assmus 2002)	59	4-6 Tage	CPC i.c. BMC i.c.	$16 \times 10^6$ $213 \times 10^6$	EF ↑16% (+8%) ESV ↓25%	LV-Angio
Chen (2004)	69 1:1 vs. Kontrolle	18 Tage	MSC aus KM i.c.		EF +36% ESV -53% Infarktgröße -60%	LV-Angio
BOOST (Wollert 2004)	60 1:1 rand.	4-6 Tage	BMC i.c. vs. rand. Kontrolle	$2,5 \times 10^6$	EF +13% ESV -2% Infarktgröße -43%	MRT
Janssens (2006)	67 1:1 rand. Placebo, double-blind	<24 h	BMC vs. i.c. Placebo	$304 \times 10^6$	EF +7% ESV -3% Infarktgröße -50%	MRT
BALANCE (Yousef 2009)	124	7 Tage	BMC i.c. vs. rand. Kontrolle	$6.1 \times 10^7$	EF +4.6% ESV -3.6 ml Infarktgröße -8.2%	LV-Angio
Cardiac Study (Piepoli 2010)	38	4 Tage	BMC i.c. vs. rand. Kontrolle	$41.8 \times 10^7$	EF +13.1%	SPECT
REGENT (Tendera 2009)	200	3-12 Tage	BMC i.c. CD34+ CXCR4+ i.c.	$178 \times 10^6$ $1.9 \times 10^6$	EF +3% EF +3%	MRT
BONAMI (Roncalli 2011)	100	7-10 Tage	BMC i.c. vs. rand. Kontrolle	$98 \times 10^6$	BMC EF +4.3% Kontrolle EF +3.3%	SPECT
ASTAMI (Lunde 2006)	100 1:1 rand.	6 Tage	BMC i.c. vs. rand. Kontrolle	$87 \times 10^6$	EF +1.9% Infarktgröße -25%	SPECT
REPAIR-AMI (Schächinger 2006)	204 1:1 rand. Placebo, doppel-blind	4 Tage	BMC i.c. vs. Placebo	$>230 \times 10^6$	EF +5,5% EF Placebo +3,0	LV-Angio
Swiss Study (Sürder 2013)	Early n=58 Late n=49 Placebo n=60	Early 6d Late 24d	BMC i.c. vs. Placebo	$140-160 \times 10^6$	EF nicht signifikant besser im vgl. zu Placebo	MRT
TIME (Traverse 2012)	120 Early und late vs. Placebo, doppel-blind	Early 3d Late 7d	BMC i.c. vs. Placebo	$147 \times 10^6$	EF nicht signifikant besser im vgl. zu Placebo	MRT
REGENERATE-AMI (Choudry 2016)	100 1:1 rand. Placebo Doppel-blind	<24h nach VWI	BMC i.c. vs. Placebo	$60 \times 10^6$	EF gering, aber nicht-signifikant verbessert	MRT (CT)

**Tab. 1.2** Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt (modifiziert nach Strauer und Steinhoff 2011, i.c. intacoronar; i.m. intramyokardial; t.e. transendokardial)

Erstautor / Studie	n	Zeitpunkt nach AMI	Applizierte Zellart	Zellzahl	Ergebnisse	Methode
Strauer (2005)	36 1:1 vs. Kontrolle	3 Mo bis 9 Jahre	BMC i.c.	$28 \times 10^6$	EF +15% Infarktgröße -30%	LV-Angio
TOPCARE-CHD (Assmus 2006)	75 BMC-Gruppe CPC-Gruppe vs. Kontrolle	> 3 Mo.	BMC i.c. Circ. Progenitor-Zellen i.c.	$205 \times 10^6$ $22 \times 10^6$	EF +7% Infarktgröße -4%	LV-Angio
STAR (Strauer 2010)	391	8,5 $\pm$ 3,2 Jahre	BMC i.c.	$6,6 \times 10^7$	EF +6,7% ESV -18ml Infarktgröße -4,5%	LV-Angio
FOCUS HF (Perin 2011)	30 2:1 rand. Placebo	chronic	BMC t.e.	$3 \times 10^7$	CCS/NYHA besser Funktion idem	LV-Angio TTE SPECT
Hu et al. (2011)	59 1:1 rand. Placebo	> 3 Monate	BMS+CABG (via Graft) vs. CABG	$10 \times 10^7$	EF +10% EF Kontrolle +5% BNP geringer	MRT SPECT BNP
PERFECT (Steinhoff 2012)	1:1 rand. Placebo, double-blind	Post-AMI (nicht genau definiert)	CD133 <sup>+</sup> BMC i.m. + CABG vs. CABG	$0,5-5 \times 10^6$	<b>Rekrutierungsphase</b>	MRT
PROMETHEUS (Karantalis 2014)	6	chronic	MSC i.m. (nicht gebypassed)	n.d.	EF +9,4% Narbenmasse -47,5%	MRT

**Tab. 1.3** Stammzelltherapie bei chronisch-ischämischer Herzkrankheit (modifiziert nach Strauer und Steinhoff 2011)

#### 1.2.4. Art der Stammzellapplikation im Rahmen klinischer Studien

Der optimale Applikationsweg ist noch nicht abschließend geklärt. So können einerseits Zellen im Rahmen einer interventionellen Prozedur transendokardial injiziert (FOCUS HF) oder intrakoronar appliziert werden (TOPCARE, BOOST, BONAMI u.a.), andererseits können die Zellen bei Operationen am offenen Herzen (in erster Linie bei CABG) transepikardial injiziert (PERFECT, PROMETHEUS) oder via neu anastomosiertem Bypass-Graft (Hu et al. 2011) eingebracht werden. Theoretisch könnten die Zellen auch retrograd über den Sinus coronarius oder transvenös appliziert werden, letzteres würde aber einen intolerablen Verlust an Zellmaterial nach sich ziehen. Beide Methoden spielen in den klinischen Überlegungen derzeit kaum eine Rolle. Als Target für die Zellapplikation wird die Infarkt- bzw. Periinfarktzone gewählt. Die transkoronare Applikation erfolgt dabei meist in der sogenannten „stop-flow“-Technik, bei der die Injektion im ehemaligen Infarktgefäß erfolgt, wobei das Gefäß proximal der Infarktzone durch einen Ballon kurzzeitig okkludiert wird. Hierdurch wird ein zu rasches Auswaschen über venöse und lymphatische Gefäße vermieden (Strauer et al. 2002). Die transendo- wie auch die transepikardiale Applikation erfolgen per direkter Nadelinjektion. Als Nach-

teil wird postuliert, dass durch Kontraktionen des Myokards die Zellen wieder „herausgedrückt“ werden könnten (Brunskill et al. 2009). Möglichweise erführen die Zellen bei schneller Injektion zudem deformationsbedingt ein mechanisches Trauma. Aus diesem Grund wird bei chirurgischem Vorgehen stattdessen ein epikardiales Patch mit inkorporierten Zellen aufgebracht (Hamdi et al. 2009). Transendokardiale Injektionen bergen theoretisch wiederum ein erhöhtes Risiko für intrakavitäre Thrombenbildung. Akute nachteilige Effekte jedweder Prozedur wurden allerdings in den bisherigen Publikationen nicht aufgeführt. Lediglich Vulliet et al. (2004) berichteten über histologisch verifizierte Mikroinfarkte mit signifikanten ST-Strecken-Hebungen während der intrakoronaren Applikation bei Versuchen an lebenden Hunden.

### 1.2.5. Zeitpunkt der Stammzellapplikation

Im Rahmen der Studien zur Wirkung von Stammzellen nach akutem Myokardinfarkt ist auch der Zeitpunkt der Stammzell-Applikation von Bedeutung. Dieser spielt eine Rolle sowohl in Hinblick auf die Vulnerabilität des Myokards (Arrhythmien, negative Inotropie) als auch auf Homing, Transdifferenzierung und parakrine Effekte der Zellen. Ein entscheidendes Kriterium für den Applikationszeitpunkt ist hierbei die Auswahl und Aufbereitung der verwendeten Zellen: BMC werden mittels Knochenmarkpunktion gewonnen, dichte zentrifugiert und isoliert, wobei man eine heterogene Gruppe mononukleärer Zellen erhält, die noch am selben Tag transplantiert werden können (BOOST-Studie, Schächinger et al. 2006). Aus dem peripheren Blut lassen sich PB-MNC und zirkulierende Progenitorzellen (CPC) gewinnen. Im Rahmen der TOPCARE-AMI-Studie (Schächinger et al. 2004) erfolgte hierfür eine Blutentnahme in den ersten 24h nach Myokardinfarkt, dann wurden die Zellen nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen transplantiert. Diese beiden Protokolle wurden u.a. im Rahmen der drei großen deutschen klinischen Studien TOPCARE-AMI, BOOST und REPAIR-AMI verwendet, bei denen die Stammzelltransplantation im Schnitt zwischen dem 3. und 7. Tag erfolgte. Die prinzipiell schnelle Aufbereitung von BMC machten sich Ge et al. (2006) zunutze: Direkt nach primärer PCI bei STEMI wurden die Patienten randomisiert und erhielten sofort eine Knochenmarkpunktion. Nach erfolgter Aufbereitung der BMC erfolgte die intrakoronare Transplantation in einem Zeitfenster von 3 Stunden, worunter weder Angina noch relevante Arrhythmien auftraten (**Tab. 1.2**). Bei den Studien zur Anwendung von Stammzellen bei chronischer Herzinsuffizienz lag der Applikationszeitpunkt typischerweise mehr als 3 Monate nach dem letzten ischämischen Ereignis (**Tab. 1.3**).

### 1.2.6. Mechanismen der Transmigration mononukleärer Zellen

Unabhängig vom Weg und der dauerhaften oder nur transienten Ansammlung von Stammzellen im Myokard ist das Homing der Stammzellen im betroffenen Gewebe ein entscheidender Schritt zur Wirksamkeit der Stammzelltherapie. Bei intravaskulärer Applikation ist in erster Linie die Überwindung der endothelialen Barriere bedeutsam. Unter anderem kommt es bei Ischämie zur vermehrten endothelialen Präsentation von VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). BM-MSC weisen hohe Mengen von Integrin  $\beta 1$  und  $\alpha 2$  auf ihrer Oberfläche auf, deren Ligand VCAM-1 ist. Über die Bindung kommt es zur endothelialen Adhäsion und schließlich Transmigration in das Gewebe (Ip et al. 2007). Die Transmigration von BM-HSC wiederum wird durch die Bindung von SDF-1 an CXCR4 (CXC chemokine receptor 4) vermittelt (Wright et al. 2002). SDF-1 wird im ischämischen Myokard hochreguliert und führt zum Homing von HSC (Askari et al. 2003, Abbott et al. 2004). Schmidt et al. untersuchten in vitro das transendotheliale Migrationsverhalten einer heterogenen Gruppe von aus menschlichem Knochenmark gewonnen mononukleären Zellen (Schmidt et al. 2006). Hierbei migrierten nach 60 Minuten ca. 50% aller BMC.

### 1.2.7. Connexin43 und BMC

Interessanterweise konnte bei der Untersuchung von Schmidt et al. (2006) an den Zellausläufern Connexin43 nachgewiesen werden. Auch in einer Untersuchung von Rastan et al., die die funktionelle und elektrophysiologische Integration von BMC in kardiales Synzytium in vitro zum Thema hatte, ließ sich ab dem 7. Tag Connexin43 immunhistochemisch bei 98% aller BMC nachweisen (Rastan et al. 2005).

Connexin43 ist das maßgebliche Protein für die Bildung von gap junctions im Myokard, jedoch werden gap junctions auch eine entscheidende Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation anderer Verbände zugeschrieben (Kumar und Gilula 1996). Eine Gruppe von 6 Connexin-Molekülen bildet dabei einen Hemichannel bzw. sogenanntes Connexon. Wenn sich benachbarte Zellen mit ihren Connexonen aneinander lagern und ganze Cluster von interzellulären Kanälen bilden, so spricht man von einer gap junction. Hierüber ist ein Transfer von Ionen, Flüssigkeiten oder Botenstoffen und somit eine elektromechanische Kopplung und/oder Kommunikation möglich. Einzelne Zellen können mittels eines solitären Connexons auch in Interaktion mit dem Extrazellularraum treten (Wong et al. 2004). Mittlerweile existieren aus-

reichend Belege für die Bildung von gap junctions sowie für eine mutmaßliche interzelluläre Kommunikation (*gap junction intercellular communication, GJIC*) bei pluripotenten embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen (Oyamada et al. 2013), mesenchymalen Stammzellen (Wang DG et al. 2014), somatischen Stammzellen (Wong et al. 2008) oder auch Leukozyten (Wong et al. 2004).

### 1.2.8. NF- $\kappa$ B (nuclear factor - kappa B)

Eine gewichtige Rolle in der frühen Antwort auf ischämischen Stress im Myokard und in BMC spielen die sogenannten frühen Gene („*early genes*“). Diese werden innerhalb weniger Minuten nach zellulärer Stimulation transkribiert und kodieren ihrerseits zumeist für weitere Transkriptionsfaktoren. Diese können mehrheitlich Familien wie Fos, Jun oder Myc zugeordnet werden. Die Transkriptionsfaktoren regulieren die Transkription genetischer Informationen aus DNA in RNA und somit die Expression jedweder Proteine, so z.B. auch von für die Zellmigration verantwortlichen Oberflächenmarkern wie VCAM1, ICAM, SDF-1 usw. (Gossen et al. 2004).

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor - kappa B*) ist ein ubiquitär vorliegender, induzierbarer Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung von ca. 300 Genen mit v.a. proinflammatorischen Effekten verantwortlich ist. Es wurde erstmals 1986 von Sen und Baltimore in B-Lymphozyten als nukleärer Faktor, der sich an die Bindungsstelle des Enhancers für die  $\kappa$ -Leichtkette von Immunglobulinen nachweisen ließ, beschrieben (Sen und Baltimore 1986). Korrekterweise handelt es sich hierbei eigentlich um eine Gruppe strukturell verwandter Transkriptionsfaktoren, namentlich NF- $\kappa$ B1 (p50, Precursor p105), NF- $\kappa$ B2 (p52, Precursor p100), RelA (p65), RelB und C-Rel, welche sich zu Homo- oder Heterodimeren zusammenfinden. Das am häufigsten vorkommende Dimer besteht aus p65 und p50 (p65/p50) (Liu und Malik 2006, Lawrence et al. 2001). Zur Vereinfachung wird im weiteren Text dieser Dissertation nur von "NF- $\kappa$ B" synonym für die verschiedenen Hetero-/Homodimere gesprochen.

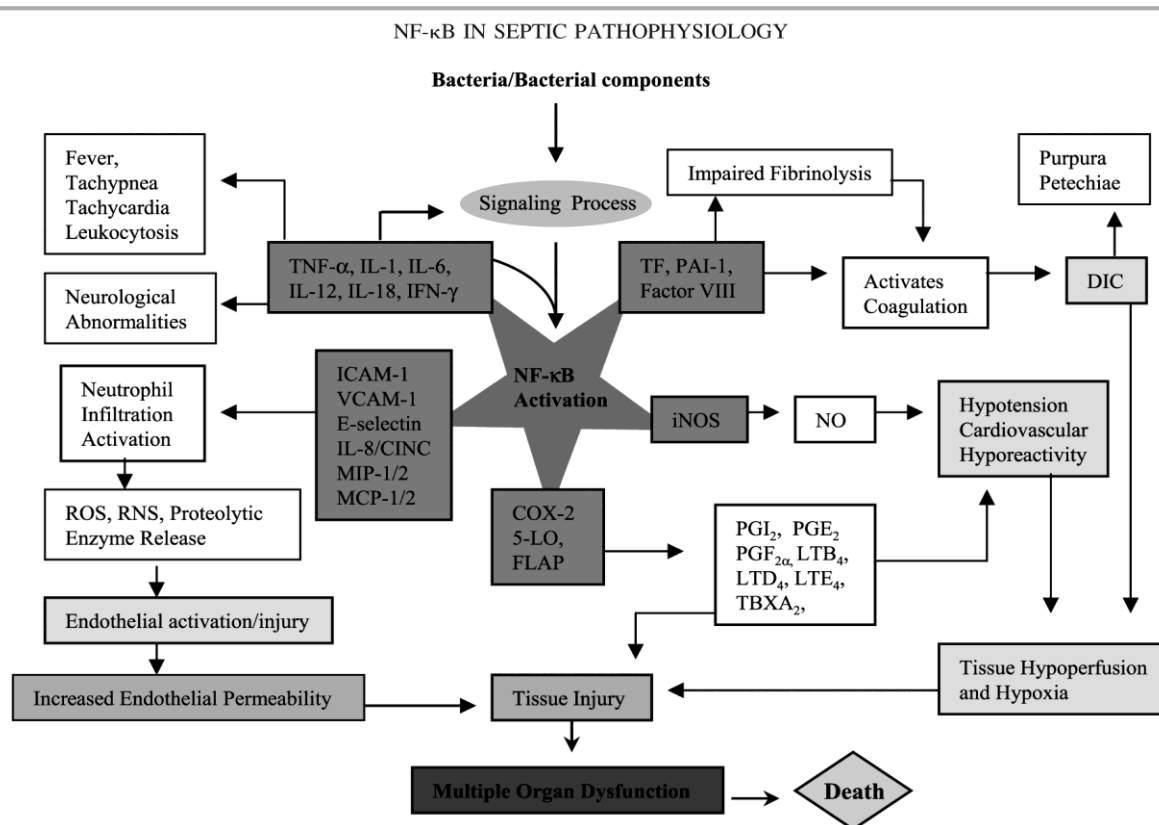
NF- $\kappa$ B liegt normalerweise in einer inaktiven Form im Zytoplasma an ein inhibitorisches Protein (*I- $\kappa$ B*) gebunden vor. Nach Phosphorylierung von I- $\kappa$ B und somit Verminderung der Bindung durch I- $\kappa$ B-Proteine transloziert NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Dies stellt den entscheidenden Schritt zur Wirkung von NF- $\kappa$ B dar. Im Nukleus wird dadurch die Transkription von Genen eingeleitet, die den entsprechenden Promoter für NF- $\kappa$ B aufweisen (Baeuerle und Baltimore

1996, Baldwin 1996). Laut einem Review von Liu existierten im Jahre 2006 bereits mehr als 460 bekannte Stimuli für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, von denen Stress jedweder Form (auch hypoxischer), reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS, auch durch Hypoxie verursacht), Mitogene, verschiedenste Mediatoren, inflammatorische Zytokine, aber auch Bakterien, Parasiten und Pilze und eine Vielfalt weiterer pathologischer Konditionen zu nennen sind (Liu und Malik 2006). In einer *in vivo* Untersuchung von Li et al. am Ischämie-Reperusions-Modell konnte ein signifikanter Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität im ischämischen Myokard bereits ab der zehnten Minute gezeigt werden (erhöhte Aktivität für mind. 180 Minuten nachweisbar), wenngleich offenbar der generelle, indirekt durch die Ischämie getriggerte Stress auch zu einem bis zu 3,5-fachen Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität im nicht-ischämischen Myokard führte (Li C et al. 2001). Ein nachweislich signifikanter Anstieg der NF- $\kappa$ B-Aktivität im ischämischen Herzen konnte noch in einer Reihe weiterer Untersuchungen gezeigt werden (Li, Browder, Kao 1999; Xuan et al. 1999, Kupatt et al. 1999, Wang Y et al. 2013).

Die Effekte der über NF- $\kappa$ B initiierten Signalkaskade sind äußerst vielfältig und abhängig von Zelltyp und Gewebe. „Die zwei bekanntesten und am besten untersuchten Funktionen von NF- $\kappa$ B sind die Regulation von immunologischen und inflammatorischen Reaktionen sowie die Regulation von Zellproliferation und Apoptose.“ (Liu und Malik 2006, S. L629). So besitzt es bei einigen Tumoren einen pro-proliferativen und antiapoptotischen, bei anderen Tumorarten jedoch einen proapoptischen Effekt. Bei der Modulation von immunologischen und inflammatorischen Prozessen ist es als Player der adaptiven Immunantwort ebenso wie als Mediator für die Expression einer Reihe proinflammatorischer Gene für z.B. Zytokine, Chemokine, Immunrezeptoren und Enzymen von Bedeutung. Eine gesteigerte NF- $\kappa$ B-Aktivität hat de facto Einfluss auf jedwede Form der Inflammation (Liu und Malik 2006). Die Auswirkungen einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind exemplarisch für die Sepsis in **Abb. 4.2** dargestellt.

Gerade bei Betrachtung des Ischämie/Reperfusionsschadens im Herzen wird über eine Reihe von in erster Linie für das Outcome negativen Effekten erhöhter NF- $\kappa$ B-Aktivität berichtet. Exemplarisch seien aufgeführt: ein Anstieg der Autophagozytose (Zeng et al. 2013), Einfluß auf die Größe des Infarktareaes (Morishita et al. 1997) und eine verstärkte Expression leukozytenadhäsiver Moleküle wie ICAM-1 (wobei ein negativer Effekt polymorphkerniger Leukozyten auf den Reperfusionsschaden vermutet wird; Kupatt et al. 1999). Als weitere Mediatoren der endothelialen Leukozytenadhäsion werden zudem VCAM-1 (Liang et al. 2014,

Kacimi et al. 1998) und VEGF (Du et al. 2014, Schmidt et al. 2006) über NF- $\kappa$ B aktiviert. VCAM-1 kann dabei sowohl an Endothelzellen, als auch an MSC nachgewiesen werden (Wang CM et al. 2014).



**Abb. 1.1** Übersicht über die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Pathophysiologie der Sepsis (Quelle: Liu und Malik 2006, S. L 636)

### 1.3. Aufgabenstellung

Untersuchungen am isolierten Säugetierherzen wurden erstmals grundlegend von Oskar Langendorff im Jahre 1895 in seiner Schrift von „Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen“ beschrieben. Das experimentelle Prinzip ist auch mehr als einhundert Jahre später dasselbe geblieben: Die Aktivität eines isoliert an der Langendorff-Apparatur hängenden, autonom schlagenden Herzens wird durch Perfusion der Koronararterien mit einer sauerstoff- und nährstoffangereicherten Lösung (Tyrode- oder Krebs-Henseleit-Lösung) aufrechterhalten. Im Versuch können dann abhängige Variablen wie Kontraktilität, Herzfrequenz und Koronarfluss und auch elektrische Potentiale bestimmt werden. So ist es zum Beispiel möglich, die Wirkung verschiedenster Substanzen (Pharmaka, Toxine etc.) zu untersuchen. Durch Gefäßli-

gatur kann auch ein Myokardinfarkt herbeigeführt werden. Die Einsatzmöglichkeiten sind vielgestaltig. Verwendet werden Herzen von Kleinsäugetern wie Mäusen, Ratten oder – wie im vorliegenden Fall – Kaninchen.

In den klinischen Studien lag der Zeitpunkt der Stammzellapplikation meist 3-7 Tage nach Myokardinfarkt, lediglich in der Studie von Ge et al. (2006) fand die Zellapplikation 3 Stunden nach Infarkt statt. In der hier vorgelegten Dissertation sollte nun im Langendorff-Modell untersucht werden, ob nach Setzen einer lokalen Myokardischämie die Infusion einer Stammzelllösung in der frühen Reperusionsphase negative Effekte auf Hämodynamik oder rhythmogene Stabilität hat und ob bei unselektiver transkoronarer Applikation eine quantitativ adäquate Zellretention möglich ist. Ein großer Vorteil bei diesem experimentellen Vorgehen liegt überdies darin, dass nach Euthanasierung der Versuchstiere Knochenmark in großer Menge leicht gewonnen werden und parallel zum Verbringen des Herzens an die Langendorff-Apparatur eine große Zahl an BMC in einem kurzen Zeitraum isoliert werden kann. Somit sollte es möglich sein, die Stammzellinfusion bereits 15 Minuten nach Ende der Ischämie zu beginnen.

In einem zweiten Schritt sollten die Herzen immunhistochemisch aufgearbeitet werden, um Hinweise auf das Homingverhalten der BMC im ischämischen/nichtischämischen Myokard zu finden. Als Stammzellmarker diene hierzu das auf HSC exprimierte Oberflächenmolekül CD117 (c-kit). HSC stellen die größte Fraktion der BMC, und ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem Myokard wurde hinreichend untersucht (s.o.). Ausgehend von den Beobachtungen von Schmidt et al. (2006, s.o.) sollte zudem untersucht werden, wieviele BMC nach 60 Minuten extravasal nachweisbar sind.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob sich analog den Ergebnissen von Schmidt et al. (2006) und Rastan et al. (2005) an c-kit+ BMC eine vermehrte Expression von Connexin43 als eine Voraussetzung für eine gap-junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation nachweisen lassen würde. Am Beispiel von NF- $\kappa$ B sollte zudem untersucht werden, ob NF- $\kappa$ B-abhängige Signalkaskaden Einfluss auf das Homing von c-kit+ BMC haben.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstiere

Verwendet wurden Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" des Lieferanten Charles River (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 2000-2500g. Alle Prozeduren wurden durch die Tierschutzkommission der Universität Leipzig genehmigt. Alle Tiere wurden unter den Bedingungen der europäischen Tierschutz-Konventionen gehalten. Die Ernährung erfolgte ad libitum mit herkömmlichem Trockenfutter und Wasser.

#### 2.1.2. Technische Ausrüstung

Autoklav	Varioklav H+P Dampfsterilisator	<i>H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim</i>
Banch	Herasafe HS12	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
Dako Pen	Dako Pen	<i>Dako GmbH, Hamburg</i>
Einbettautomat	Tissue Tek VIP 150	<i>Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, USA</i>
Einbettkassetten	Einbettkassette "Standard"	<i>Süsse Labortechnik, Guldensberg</i>
Inkubator 37°C	Heraeus Function line	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
Inkubator 60°C	Memmert Model UFB 400	<i>Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach</i>
Kühlplatte	Medax 70045 KM 404A	<i>Medax GmbH und Co.KG, Rendsburg</i>
Kühlschrank	Siemens KS 24V300	<i>Siemens AG, München</i>
Langendorff-Apparatur	Eigenbau	
Magnetheizrührer	Heidolph MR 2002	<i>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co.KG, Schwabach</i>
Mikroskope	Zeiss Axiovert 25	<i>Carl Zeiss MicroImaging GmbH,</i>

		<i>Jena</i>
Mikroskope	Zeiss Axioplan 2 mit AxioCam MRc5	<i>Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena</i>
Mikrotom	Microm HM 400 R	<i>MICROM International GmbH, Walldorf</i>
Mikrotomklingen	Feather Microtome Blades S22	<i>FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan</i>
Mikrowelle	Lotus "Time", MW-817	<i>Mediamarkt GmbH</i>
Neubauer-Zählkammer	"Assistent"-Zählkammer	<i>Karl Hecht GmbH, Sondheim</i>
Objektträger	Super Frost Ultra Plus	<i>Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH &amp; Co.KG, Braunschweig</i>
Paraffinbad	Medax 7204	<i>Medax GmbH und Co.KG, Rendsburg</i>
pH-Meter	inoLab pH Level 1	<i>WTW GmbH &amp; Co.KG, Weilheim</i>
Pipettenspitzen	ep T.I.P.S.	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Pipettierhilfe	"pipetus"	<i>Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt</i>
Plattformschüttler	Heidolph Duomax 1030	<i>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co.KG, Schwabach</i>
Reinstwasseranlage	Milli-Q RG	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>
Tubes 5ml	Eppendorf Tubes	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Vortex Mixer	Gemmy VM300	<i>Gemmy Industrial Corp., Taipei, Taiwan</i>
Waagen	Analysenwaage Sartorius BP 210D	<i>Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove Village, IL, USA</i>
	Laborwaage FA 3100-2	<i>Faust, Dresden</i>
Wasserbad	Medax 24900	<i>Medax GmbH und Co.KG, Rendsburg</i>
Zentrifugen	Heraeus Biofuge stratos	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
	Heraeus Megafuge 1.0R	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
	Eppendorf Centrifuge 5417R	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

### 2.1.3. Software

Zeiss Axiovision Rel 4.5

*Carl Zeiss MicroImaging GmbH,  
Jena*

Adobe Photoshop Elements 2.0

*Adobe Systems GmbH, München*

Microsoft Word und Excel 2007

*Microsoft AG, Redmond, U.S.A.*

### 2.1.4. Chemikalien und Medikamente

AEC-Kit

*Dako GmbH, Hamburg*

Antibody Diluent

*Dako GmbH, Hamburg*

Bretschneider-Lösung (Custodiol®)

*Dr. F. Köhler Chemie GmbH,  
Bensheim*

DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole-dihydrochloride)

*Roche Diagnostics GmbH, Mann-  
heim*

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

EDTA

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

Eosin (0,5%)

*Carl Roth GmbH & Co.KG,  
Karlsruhe*

Fluorescence Mounting Medium

*Dako GmbH, Hamburg*

Glycerol-Gelatine

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

Hämalaun (nach Mayer)

*Carl Roth GmbH & Co.KG,  
Karlsruhe*

Heparin (Heparin, Natriumalz)

*B. Braun AG, Melsungen*

Histopaque 1077

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

Milchpulver (Blotting Grade)

*Carl Roth GmbH & Co.KG,  
Karlsruhe*

Paraffin: Vogel HistoComp

*Vogel GmbH & Co. KG, Giessen*

Paraformaldehyd 4%

*Carl Roth GmbH & Co.KG,  
Karlsruhe*

Pentobarbital (Narcoren®)

*Merial GmbH, Hallbergmoos*

Trypanblau 0,4%

*GIBCO/ Invitrogen Corp., Carls-  
bad, CA, USA*

Trypsin

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

Tween 20

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

Vybrant DiI

*Invitrogen Corp., Carlsbad, USA*

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A. und stammten entweder von der Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe) oder der Merck KGaA (Darmstadt).

### **Tyrode-Lösung**

Zum Einsatz kam eine modifizierte, kaliumreiche Tyrodelösung mit folgender Zusammensetzung:

Na<sup>+</sup> 161,02 mmol/l; K<sup>+</sup> 5,36 mmol/l; Ca<sup>2+</sup> 1,8 mmol/l; Mg<sup>2+</sup> 1,05 mmol/l; Cl<sup>-</sup> 147,86 mmol/l; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 23,8 mmol/l; PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0,42 mmol/l; Glucose 11,1 mmol/l, äquilibriert mit 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, pH 7,4

### **2.1.5. Immunhistologie**

Als Antikörper und Detection Kits wurden Produkte folgender Firmen verwendet:

*CHEMICON International, Inc., Temecula, USA*

*Dako GmbH, Hamburg*

*Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA*

*PerkinElmer LAS (Germany) GmbH*

*Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg*

*Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim*

### **Primärantikörper und verwendete Verdünnungen**

- Sheep anti-c-fos (Chemicon, ab1584, polyclonal) 1:500
- Mouse anti-NF-κB (p65) (Santa Cruz, sc 8008, monoclonal) 1:50
- Goat anti-c-kit (Santa Cruz, sc-168, polyclonal) 1:50
- Mouse anti-Connexin43 (Chemicon, mab 3068, monoclonal) 1:100

### **Sekundärantikörper und verwendete Verdünnungen**

- Rabbit anti-mouse-FITC (Dako, F0261) 1:32
- Rabbit anti-goat-POD (Sigma, A-5420) 1:200
- Rabbit anti-mouse-POD (Sigma, A-9044) 1:200
- Donkey anti-sheep-FITC (Sigma, F-7634) 1:40

**Sonstige**

- TSA-Biotin-System (PerkinElmer, NEL700)
  - Biotinyliertes Tyramid 1:50
- Streptavidin/Alexa568 (Molecular Probes, S11226) 1:50
- Streptavidin/Alexa488 (Molecular Probes, S11223) 1:50

**2.1.6. Waschpuffer und Antigenretrieval-Lösungen****Waschpuffer**

**TBS 10x** (Tris Buffered Saline, 0,5M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,6)

**TNT** (0,1M Tris, 0,15M NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5)

**PBS 2mM-EDTA, steril** (1,5mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 120mM NaCl, 2,7mM KCl, 2mM EDTA)

**Puffer zur Antigendemaskierung**

**NaCitrat-Puffer 10x** (0,1M Na-Citrat, pH 6,0)

**EDTA-Puffer** (1mM EDTA, pH 8,0)

**Trypsin-Lösung** (0,1% Trypsin, 0,1%  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,8)

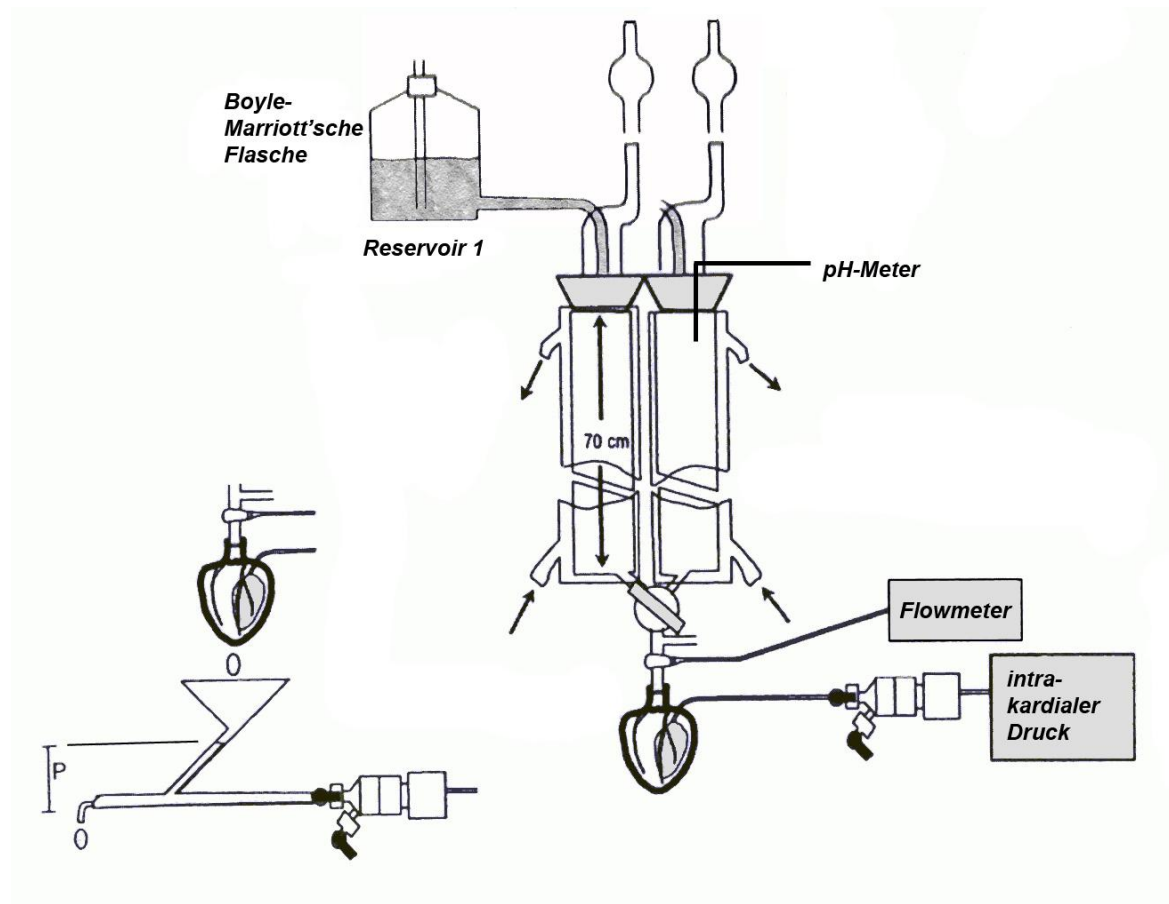
**Anmerkung:** Die verwendeten Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen in Aqua dest. gelöst. Anschließend erfolgte die pH-Wert-Einstellung mit **1M** HCl oder **1M** NaOH. Zur endgültigen Verwendung wurden die Stamm-Lösungen mit Aqua dest. auf die einfache Konzentration (1x) verdünnt. Sofern nicht gesondert vermerkt, beziehen sich die im methodischen Teil dieser Arbeit beschriebenen Lösungen stets auf die hier angegebenen Konzentrationen, pH-Werte etc.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Langendorff-Versuch und BMC-Isolation

#### 2.2.1.1. Aufbau der Langendorff-Versuchsapparatur

Bei dieser Doktorarbeit wurde ein druckkonstantes System nach Langendorff eingesetzt (Dhein 2005). Diese Langendorff-Apparatur besteht aus 2 temperierbaren doppelwandigen Glassäulen, an deren Boden sich Begasungsfritten zur kontinuierlichen Begasung der Tyrodelösung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) befinden (**Abb. 2.1**). Über die Änderung der Carbogenbeimischung ist die pH-Wert-Einstellung möglich. Über einen Vierwegehahn sind die Glassäulen mit der Aortenkanüle verbunden. Der Vierwegehahn bietet die Möglichkeit, dem Perfusat eine weitere Lösung, in diesem Fall die Stammzellinfusion, beizugeben. Die Aorta ascendens des Versuchsherzens wird über die Aortenkanüle gestülpt, mit einem Faden umschlungen und fest fixiert, so dass das Herz frei hängen und kontrahieren kann. Dabei muss die korrekte Lage der Aortenkanüle oberhalb der Koronarostien beachtet werden. Die Tyrodelösung perfundiert nun bei gleichzeitig geschlossener Aortenklappe retrograd die Koronarien. Der Perfusionsdruck wird dabei hydrostatisch mittels Einsatz einer Mariotti'schen Flasche, welche oberhalb der Begasungsfritte platziert wird, konstant gehalten. Der zu wählende Perfusionsdruck ist vom jeweiligen Tierpräparat abhängig, da ein zu geringer Perfusionsdruck eine unzureichende Koronarperfusion, ein zu hoher die Gefahr eines myokardialen Ödems mit sich bringt. Im Falle eines Kaninchenherzens hat sich ein Perfusionsdruck von 70cm Wassersäule als optimal erwiesen (Dhein 2005). Mittels eines Umluftthermostaten erfolgt die Einstellung einer konstanten Temperatur von 37°C. Die Perfusionslösung durchströmt nun die Koronarien und wird über den Sinus coronarius in den rechten Vorhof geleitet. Da die Venae cavae ligiert sind, kann das koronarvenöse Perfusat (=Effluat) über eine im Truncus pulmonalis fixierte Kanüle abgeleitet, quantifiziert und für qualitative Untersuchungen verwendet werden. Zur isovolumetrischen Registrierung der linksventrikulären Drücke wird ein flüssigkeitsgefüllter Latexballon von drei bis fünf Millimeter Größe über eine Inzision im linken Vorhof im linken Ventrikel platziert. Mittels einer Spritze kann der Füllungsgrad des Ballons auch nach Insertion in den linken Ventrikel geändert und somit der optimale enddiastolische Druck zu Beginn des Versuchs eingestellt werden (Ziel: 4-8 mmHg). Um selektiv eine reversible Ischämie herbeizuführen, wird am Versuchsherzen der Ramus interventricularis anterior (RIVA) freipräpariert und ein Ligaturfaden vorgelegt.



**Abb. 2.1** Druckkonstantes System nach Langendorff  
(Quelle: Dhein 2005, S. 167)

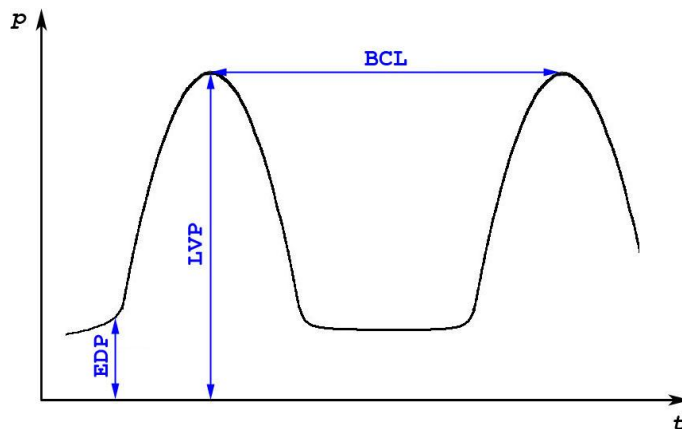
### 2.2.1.2. Erfassbare Parameter während des Langendorff-Versuches

Als funktionelle Parameter können in diesem Versuch der linksventrikuläre Druck (LVP), der enddiastolische Druck (EDP), die Herzfrequenz in Form der Herzzykluslänge (basic cycle length = BCL) und der Koronarfluß (CF) erhoben werden. Weiterhin läßt sich die Zellzahl im Perfusat (vor Infusion) und im Effluat (nach Perfusion) in der Neubauer-Zählkammer bestimmen.

#### 2.2.1.2.1. Druck-Zeit-Kurven

Über eine mit dem im linken Ventrikel befindlichen Latexballon verbundene Stahlkanüle können die linksventrikulären Drücke mittels eines angeschlossenen Druckmessumformers kontinuierlich registriert und eine Druck-Zeit-Kurve erfasst werden. Hierbei werden der enddiastolische Druck (EDP), der endsystolische (maximale) linksventrikuläre Druck (LVP) so-

wie die Zykluslänge (BCL) zwischen zwei Druckmaxima (alternativ angegeben: Herzfrequenz (HF) =  $60\text{sek/min} \cdot \text{BCL}^{-1}$ ) bestimmt.



**Abb. 2.2** Druck-Zeit-Kurve (EDP = end diastolic pressure, LVP = left ventricular pressure, BCL = basic cycle length)

#### 2.2.1.2.2. Koronarer Fluss (CF)

Die retrograd die Koronararterien perfundierende Tyrodelösung, wird als Effluat über die Kanüle im Truncus pulmonalis ausgeworfen. Das Effluat wird zu im Protokoll vorab definierten Zeitpunkten über 1 Minute in einem Meßzylinder aufgefangen. Der koronare Fluss lässt sich dann als Quotient von aufgefangenem Effluat und Zeit berechnen (Einheit: ml/min).

#### 2.2.1.2.3. Registrierung extrazellulärer Potentiale ("EKG")

Während des gesamten Versuches erfolgt eine kontinuierliche 256-Kanal-Registrierung extrazellulärer unipolarer Potentiale. Hierfür werden um das Herz 4 Polyesterplatten orthogonal angeordnet. In diese Polyesterplatten sind in einer 8x8 Matrix insgesamt 256 AgCl-Elektroden eingegossen. Durch die abgeleiteten Potentiale sind mit entsprechender Hard- und Software sowohl eine Rhythmusanalyse als auch über ein ST-Mapping die Erfassung von Veränderungen der ST-Strecke im Rahmen der Ischämie möglich (Dhein 1992).

#### 2.2.1.3. Präparation der Kaninchenherzen

Nach intramuskulärer Anästhesie der Kaninchen erfolgt zunächst die Injektion von 1000 IE Heparin /kgKG in eine Ohrvene zur Vermeidung von Thrombenbildung. Nach mehreren Kreislaufzeiten und vollständiger Anästhesie wird die Euthanasierung mittels Durchtrennung von Karotiden und Trachea sowie anschließendem Ausbluten durchgeführt. Zur Präparation des Herzens werden zunächst das Brustfell entfernt und anschließend die untere



Thoraxapertur sowie das Zwerchfell durch Inzision eröffnet. Daraufhin werden die Rippen durchtrennt und das Herz freigelegt. Nach Inzision des Perikards folgt die stumpfe Präparation von Aorta und Truncus pulmonalis. Beide werden nach Vorlage eines chirurgischen Knotens durchtrennt sowie die entsprechenden Kanülen eingeführt und fixiert. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die langsame intrakoronare Injektion von 20ml 4°C kalter kardioplegischer Lösung nach Bretschneider, um die Transferzeit an die Langendorff-Apparatur zu überbrücken. Abschließend werden die Hohlvenen und Pulmonalvenen durch Massenligatur abgetrennt und das Versuchsherz an die Langendorff-Apparatur überführt.

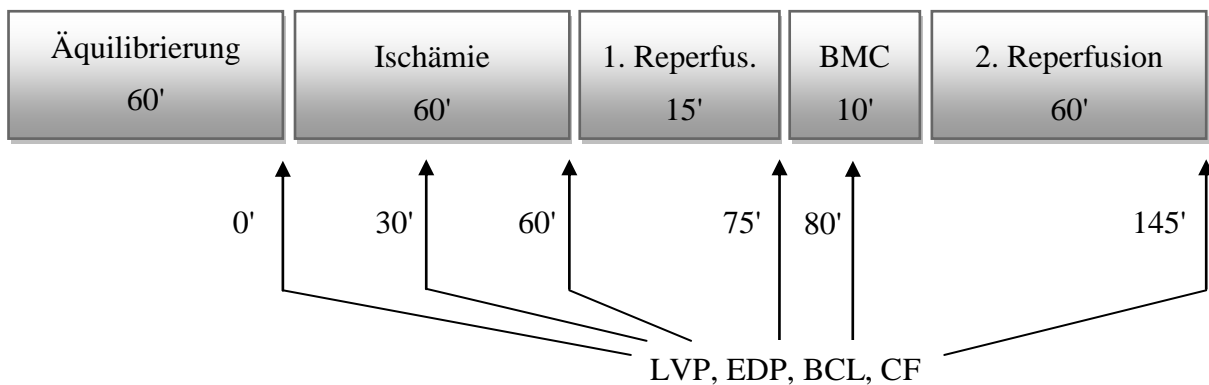
#### **2.2.1.4. Isolation von Knochenmarkstammzellen (BMC)**

Die Isolation der BMCs erfolgt nach Euthanasierung zeitgleich zur Installation des Herzens am Langendorff-Apparat durch einen zweiten Experimentator. Zur Gewinnung des Knochenmarks werden die langen Röhrenknochen (Femur und Humerus) beidseits verwendet. Das Knochenmark wird mit dem scharfen Löffel ausgekratzt und in PBS/ 2mM EDTA suspendiert. Nach einem ersten Waschgang in der Zentrifuge bei 300g für 5 Minuten können kleinere Spongiosa-Stückchen, Bindegewebe etc. entfernt werden. Anschließend erfolgen eine Resuspension in PBS/ 2mM EDTA und abermals Waschen bei 300g für 5 Minuten. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 3ml PBS/ 2mM EDTA resuspendiert und für die eigentliche BMC-Isolation vorsichtig auf 6ml Histopaque 1077 aufgeschichtet. Die Zellen werden bei 500g für 30 Minuten dichte-zentrifugiert. Die dadurch entstehende Bande enthält nun den Großteil der BMCs und wird nach vorsichtigem Abheben abermals in PBS/ 2mM EDTA für 5 Minuten bei 300g gewaschen. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Zum Schluß werden die Zellen in 10ml PBS/ 2mM EDTA resuspendiert und mit einer 10ml Spritze aufgezogen.

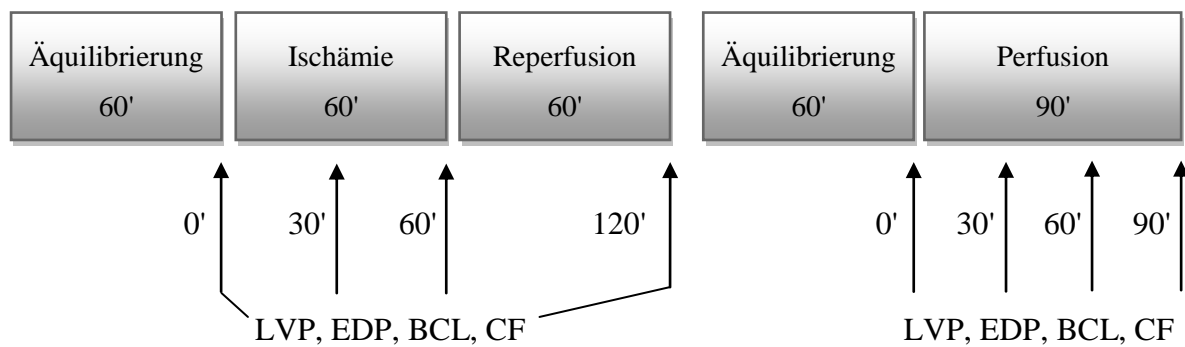
Zum Nachweis der Zell-Vitalität und Bestimmung der Zellzahl werden nach dem ersten Waschgang und direkt vor der intrakoronaren Infusion der Zellen jeweils 10µl entnommen, mit 10µl Trypanblau-Lösung gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Nur vitale Zellen können Trypanblau aufnehmen, sodass über die Gesamtzahl der Zellen und die Zahl der angefärbten Zellen eine Aussage zum Prozentsatz der vitalen Zellen getroffen werden kann.

### 2.2.1.5. Durchführung des Langendorff-Versuches

Insgesamt wurden sechs Versuchsreihen sowie zwei Zeit-Kontroll-Serien durchgeführt. In den Versuchsreihen *IschämieBMC* wurde nach einer Äquilibrationsphase von 60 Minuten der RIVA ligiert und eine Ischämie über 60 Minuten herbeigeführt. Danach wurden die Herzen nach Lösen des Ligaturfadens für 15 Minuten reperfundiert, bevor die vollständige intrakoronare Infusion der in 10ml NaCl suspendierten BMC mit einer Laufrate von 1ml/min über einen Zeitraum von 10 Minuten parallel zur Tyrodelösungsperfusion durchgeführt wurde. Um die Zahl der retinierten BMC zu erhöhen, wurden in 2 Versuchen (0510 und 1310) die im Effluat aufgefangenen Zellen einmalig reinfundiert. Abschließend erfolgte eine zweite Reperfusionphase von 60 Minuten, um ein geeignetes Zeitfenster für die Zelltransmigration zu gewährleisten. Die Parameter LVP, EDP, BCL und CF wurden zu den in **Abb. 2.3** definierten Zeiten aufgezeichnet. Nach Beendigung des Versuches wurden die Herzen zur histologischen Weiterverarbeitung vorbereitet. Die Zeit-Kontroll-Serien bestanden aus einer reinen Perfusionsuntersuchung über 90 Minuten (*KontrollePerfusion*) sowie einer 60-minütigen Ischämie ohne BMC-Infusion mit anschließend 60-minütiger Reperfusionphase (*KontrolleIschämie*) (**Abb. 2.4a** und **2.4b**: die Zeitpunkte der Messwertabnahme sind analog dargestellt). Eine Histologie wurde in den Kontrollserien nicht angefertigt.



**Abb. 2.3** Versuchsablauf *IschämieBMC*: Nach 60 Minuten Äquilibration wurde die Ligatur des RIVA durchgeführt, nach weiteren 60 Minuten wieder gelöst. Nach 15-minütiger Reperfusion erfolgte die BMC-Infusion über 10 Minuten (in 2 Versuchen erfolgte eine zweite BMC-Infusion) mit abschließender 60 minütiger Reperfusion.



**Abb. 2.4a** Versuchsaufbau *Kontrolle Ischämie*: Nach 60 Minuten Äquilibration wurde die Ligatur des RIVA durchgeführt, nach weiteren 60 Minuten wieder gelöst. Anschließend folgte eine zweite Reperfusionsphase über 60 Minuten.

**Abb. 2.4b** Versuchsaufbau *Kontrolle-Perfusion*: Nach 60 Minuten Äquilibration folgte eine Perfusionsphase über 90 Minuten.

#### 2.2.1.6. Bestimmung von Anzahl und Retention der BMCs

Zur Bestimmung der Zellretention wurden jeweils vor und während der Infusion der isolierten BMC Zellzählungen durchgeführt. Die Zellretention ergibt sich als Differenz aus gesamt infundierten und während der Infusionsdauer ( $t = 10\text{min}$ ) im Effluat gesamt wiedergefundenen Zellen. Da die Infusionslösung mit den BMC mit einer konstanten Rate von  $1\text{ml/min}$  über einen Zeitraum von 10 Minuten der Tyrodelösung zugesetzt wurde, ergab sich mit unterschiedlichem Koronarfluß eine Konzentrationsänderung von ausgespülten BMC im Effluat. Daher bietet sich die Kalkulation mit absoluten Zellzahlen eher als mit Zellkonzentrationen an. Die Zellzählungen erfolgten auch hier in der Neubauer-Zählkammer.

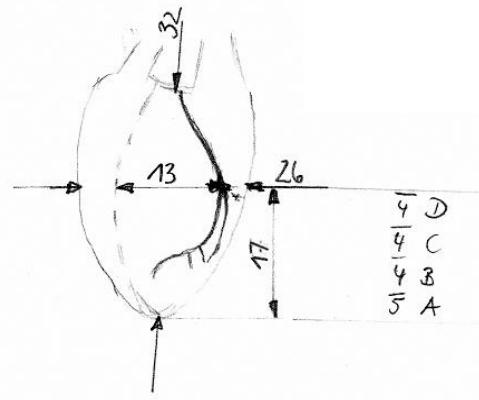
$\begin{aligned}\text{Zellretention} &= \text{gesamt infundierte Zellen} - \text{gesamt im Effluat aufgefangene Zellen} \\ &= \text{infundierte Zellen} - \text{CF} \cdot 10\text{min} \cdot (\text{Zellkonzentration im Effluat})\end{aligned}$
--

### 2.2.2. Histologie

#### 2.2.2.1. Fixierung der Kaninchenherzen

Nach Beendigung des eigentlichen Langendorff-Versuches erfolgte am noch an der Langendorff-Apparatur befindlichen Herzen eine 10-minütige Perfusionsfixierung, nach der das Herz von der Apparatur genommen und in einem kleinen Behälter für 24 Stunden bei

Raumtemperatur immersionsfixiert wurde. Als Fixierlösung kam das weitverbreitete 4%-ige Paraformaldehyd (neutralgepuffert) zum Einsatz. In der Immersionslösung war eine Aufbewahrung über Tage bis Wochen möglich. Anschließend wurden die Kaninchenherzen distal der Ligatur in vier 4-5mm starke transversale Gewebsblöcke zerlegt und beginnend von apikal mit den Buchstaben A bis D gekennzeichnet. Dem wurden Kennziffern mit dem Datum des Experiments vorangestellt, z.B. 1410. Die Höhen der Gewebsblöcke sowie die zuvor gemessene Gesamthöhen der Kaninchenherzen wurden für weitere Volumenbestimmungen erfasst (**Abb. 2.5**). Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin.



**Abb. 2.5** Schematische Darstellung eines Kaninchenherzens mit Angabe von Gesamthöhe, Position der Ligatur und Verlauf des ligierten Gefäßes sowie der Dicken der vier gewonnenen Gewebsblöcke (distal der Ligatur, von apikal beginnend bezeichnet mit A bis D)

### 2.2.2.2. Paraffineinbettung

Paraffin ist eine wachsähnliche Substanz und bezeichnet ein Gemisch von Alkanen. Durch seine inerten Reaktionseigenschaften ist es zur Aufbewahrung und weiteren Verarbeitung von mikroskopischen Präparaten gut geeignet und daher sehr weit verbreitet. Durch neue Möglichkeiten der Antigendemaskierung hat es als Einbettmedium in der Immunhistologie wieder einen großen Stellenwert gewonnen. Da Paraffin eine hydrophobe Substanz ist, muss die Gewebeprobe aus dem wasserlöslichen Formalin über eine verdünnte Alkoholreihe (Ethanol oder Isopropanol) in das fettlösende Lösungsmittel Xylol überführt werden. Um Schäden am Gewebe wie Zerreißen etc. zu vermeiden, sind entsprechend lange und viele Waschschrte notwendig, die üblicherweise in einem vollautomatisierten Einbettautomaten durchgeführt werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden die nun von Paraffin durchtränkten Gewebeproben mit flüssigem Paraffin in die Einbettkassetten gegeben und auf der Kühlplatte zum Aushärten gebracht.

### **2.2.2.3. Erstellen von histologischen Schnitten und Entparaffinierung**

Die jeweils ca. 5mm starken Paraffinblöcke wurden auf der Kälteplatte zur besseren Verarbeitung auf ca. -12°C abgekühlt und anschließend mit dem Mikrotom in 5µm dünne Paraffinscheiben geschnitten. Zur Glättung der Schnitte wurden diese danach für 10-15 Minuten im handwarmen Wasserbad belassen und anschließend auf sialinisierte Objektträger aufgezogen. Als letztes erfolgte die Trocknung der Schnitte im 60°C-Ofen für ca. 2 Stunden. Für die weitere Arbeit mit dem Gewebe musste das Paraffin von den histologischen Schnitten wieder entfernt werden. Zunächst wurde in 3 nacheinander zu durchlaufenden Xylol-Bädern (je 15 Minuten) das Paraffin gelöst. Xylol ist ein unpolares Lösungsmittel und daher nur schlecht wasserlöslich. Da die meisten Farbstoffe und Agenzien der Immunhistologie aber auf Wasserbasis beruhen, wurde das histologische Präparat nach der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe in die wässrige Phase überführt (nacheinander 100%, 96%, 70 % Ethanol für jeweils 5 Minuten).

### **2.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)**

Von jedem Gewebeblock wurde eine H.E.-Übersichtsfärbung angefertigt. Hierdurch konnten anatomische Strukturen beurteilt und entlang des Verlaufes des RIVA das von der Ischämie betroffene Versorgungsgebiet sowie eine linksventrikuläre, dorsal gelegene Vergleichszone und eine rechtsventrikuläre Vergleichszone definiert werden. Zudem konnte Myokard gegen Fibrosierungen im Sinne von Vernarbungen etc. abgegrenzt werden. Desweiteren ließen sich Größen und Wandstärken von linkem und rechtem Ventrikel abschätzen. Für die H.E.-Färbung (nach Burck 1988) wurden die auf Gewebeträger aufgezogenen Schnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in die wässrige Phase überführt. Dann erfolgte die Färbung in Hämalalaun für 10 Minuten, gefolgt von einer Spülung in Aqua dest. und anschließend dem "Bläuen" in Leitungswasser für 15 Minuten. (Wechsel nach jeweils 5 und 10 Minuten). Nach erneuter Spülung mit Aqua dest. erfolgte die Färbung mit Eosin (+ 1 Tropfen Essigsäure) für 1 Minute mit abschließender Spülung in Aqua dest. und Überführung in Xylol über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96% und 100% für je 2 Minuten). Abschließend Eindeckelung mit Dako Fluorescence Mounting Medium.

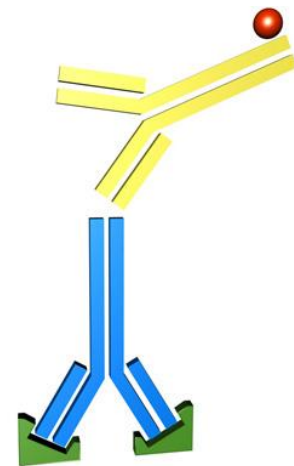
## 2.2.2.5. Immunhistologie

### 2.2.2.5.1. Grundlagen der Immunhistologie

Die grundlegende Idee der Immunhistologie bzw. Immunhistochemie ist die Markierung von Antigenstrukturen (genauer: Epitopen) durch spezifisch (nicht-kovalent) bindende Antikörper. Dadurch sind sowohl quantitative Aussagen über das Vorhandensein und die Verteilung als auch qualitative Aussagen über die gesuchte Antigenstruktur möglich. Zu den Bedingungen, die ein solcher sogenannter Primärantikörper zu erfüllen hat, sind eine hohe Spezifität und Sensitivität für das Zielantigen zu zählen. Monoklonale Antikörper gelten gemeinhin als sehr spezifisch, homogen und leicht charakterisierbar (Bönisch und Henne 2003). Da die Bindung des Antikörpers an das Epitop den Regeln einer chemischen Reaktion folgt, gilt es Variablen wie Antikörperverdünnungen, pH-Wert, Temperatur und Inkubationszeit jeweils optimal einzustellen. Allein die Bindung des Primärantikörpers lässt sich nicht von außen beurteilen. Daher muss der Antikörper selbst oder ein zweiter, gegen diesen gerichteter Antikörper an eine Markersubstanz, meist einen Farbstoff oder ein Enzym, das wiederum eine Farbstoffreaktion katalysiert, gekoppelt sein. Details dazu sowie Probleme der Immunhistochemie/-logie werden im Folgenden beschrieben.

### 2.2.2.5.2. Färbemethoden, Detektionssysteme (nach Bönisch und Henne 2003)

Wie bereits erwähnt, muss der gebundene Primärantikörper durch eine weitere Reaktion „sichtbar“ gemacht werden. Durch eingefügte Waschschrte wird zunächst überschüssiger, nicht gebundener Primärantikörper entfernt. Prinzipiell wäre durch den Einsatz eines mit einem Marker versehenen Primärantikörpers bereits jetzt eine Detektion möglich (sog. *direkte* Methode) allerdings ist diese Methode bei oft geringen nachzuweisenden Antigenmengen nicht ausreichend sensitiv. Daher kommen bei der *indirekten* Methode sogenannte Sekundärantikörper zum Einsatz, die meistens gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet sind. Der



**Abb. 2.6:** Indirekte Methode mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper

Sekundärantikörper ist entweder mit einem Fluorochrom oder einem Enzym markiert (**Abb. 2.6**). Das Fluorochrom kann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern sichtbar gemacht werden. Durch die Kombination verschiedener Fluorochrome lassen sich innerhalb

eines Präparats verschiedene Antigene gleichzeitig darstellen. Alternativ kann ein an den Antikörper gebundenes Enzym Reaktionen katalysieren, bei denen ein Farbstoffsubstrat (Chromogen) umgesetzt wird, das auch unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist (**Tab. 2.1**).

Peroxidase (POD) = Horseradisch peroxidase (HRP) (unter Zusatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)
	DAB (3,3'-Diaminobenzidin)
	Luminol
Alkalische Phosphatase (AP)	Fuchsin
	NBT/BCIP
	Naphthol As-Mx-Phosphat (Fast Red)

**Tab. 2.1:** Liste gebräuchlicher konjugierter Enzyme und deren Chromogene

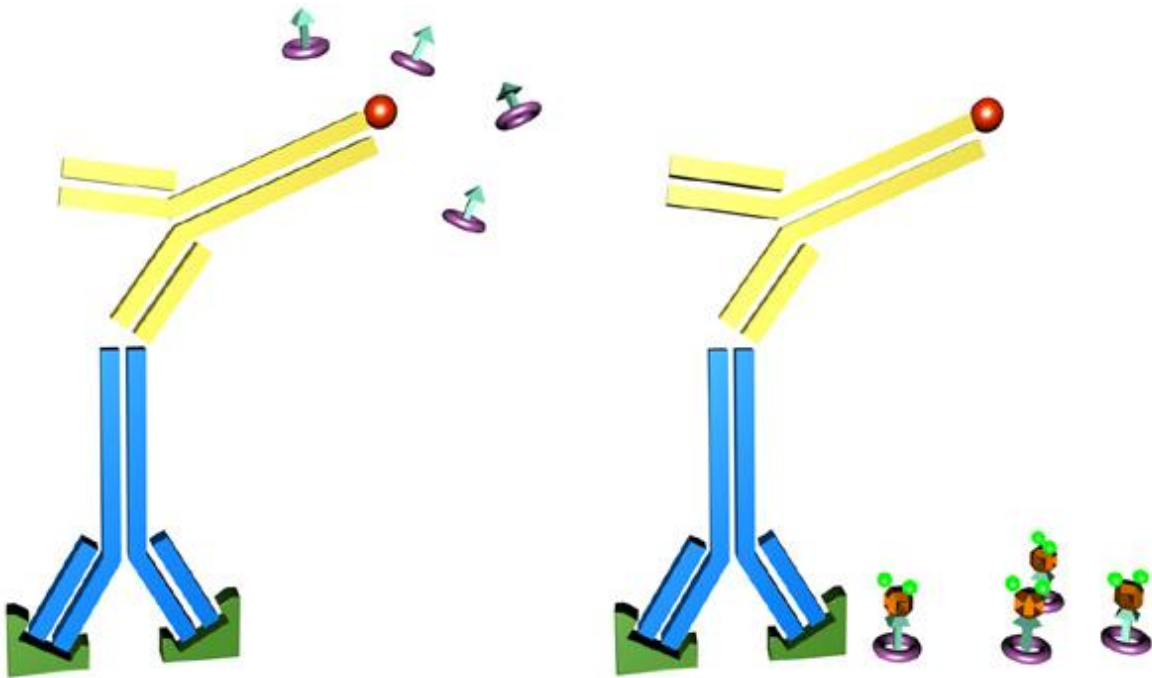
Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen kommen Mehrschrittmethoden zum Einsatz:

- Lösliche Enzym-Immunkomplex-Methoden (APAAP, PAP)
- Streptavidin-Biotin-Methoden
  - Streptavidin-Biotin Methode mit Tyramid-Signalverstärkung (TSA)
  - Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)
- Polymerkonjugat-Methoden (EPOS)

Die heute geläufigsten Methoden mit einer ausreichend hohen Sensitivität machen sich die hohe Affinität von *Streptavidin* für *Biotin* zu Nutze. Streptavidin, ein Eiweiß aus *Streptomyces avidinii*, besitzt insgesamt 4 Bindungsstellen für Biotin, wodurch biotinkonjugierte Antikörper oder Substrate (=biotinyliert) beliebig mit- und untereinander verknüpft werden können. Es existieren mehrere Abwandlungen der Methode, u. a. die Signalverstärkung mit *biotinyliertem Tyramid*, die nun exemplarisch und in der Form, wie sie in dieser Doktorarbeit angewandt wurde, beschrieben werden soll (*CSA, Catalized Signal Amplification* bzw. *TSA, Tyramide Signal Amplification*):

Tyramid kann durch das Enzym Peroxidase von seiner löslichen in eine reaktive und schließlich unlösliche Form überführt werden. Es präzipitiert also in großen Mengen im Bereich seines Reaktionsortes. Durch die Biotinylierung des Tyramids stehen nun am Reaktionsort viele Biotin-Moleküle zur Bindung von Streptavidin bereit, welches seinerseits entweder mit Peroxidase oder aber einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Reagenzien in folgender Reihenfolge zugegeben (**Abb. 2.7**):

1. unkonjugierter Primärantikörper
2. Peroxidase-gelabelter Sekundärantikörper
3. biotinyliertes Tyramid
4. Streptavidin/Fluorochrom (z.B. Alexa568)



**Abb. 2.7** *TSA-Methode* Schritt 3 und 4: Das biotinylierte Tyramid geht durch die Reaktion mit der Peroxidase in die unlösliche Form über und fällt aus (links). Das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Streptavidin bindet an das Biotin (rechts).

#### 2.2.2.5.3. Doppel- und Mehrfachfärbungen

Innerhalb eines histologischen Präparates lassen sich mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern unterschiedliche Antigene nachweisen. Prinzipiell kann hierbei nach den gleichen Protokollen wie bei Einfachfärbungen verfahren werden, entweder indem man statt nur einem alle Primärantikörper (und dann Sekundärantikörper etc.) gleichzeitig auf das Präparat gibt, oder aber die Färbung der einzelnen Antigene nacheinander ausführt. Adaptiert an das unterschiedliche Färbeverhalten der einzelnen Antigene wurden in dieser Arbeit die Primärantikörper zunächst simultan inkubiert und dann mittels *einfacher indirekter Methode* (Connexin43) sekundärgelabelt oder mittels *TSA-Methode* verstärkt (c-kit und NF- $\kappa$ B). Die Sekundärmarkierungen wurden hierbei in mehreren Schritten nacheinander durchgeführt.



#### 2.2.2.5.4. Antigendemaskierung

Während des Fixierungsprozesses neigen einige Proteine zur Ausbildung von Quervernetzungen (Cross-Links), sowohl innerhalb eines Moleküls als auch mit anderen Proteinen (intermolekulare Cross-Links). Dadurch kommt es zu Veränderungen der Tertiärstruktur und damit zur „Maskierung“ von für die Immunodetektion entscheidenden Epitopen. Die Aufhebung dieser „Maskierung“ durch Aufbrechen der Cross-Links gelang in der Vergangenheit zunächst durch den Einsatz proteolytischer Enzyme, v.a. Trypsin (Bönisch und Henne 2003, Werner et al. 2000). Viel häufiger zum Einsatz kommen heute jedoch Methoden der hitzeinduzierten Antigendemaskierung (*heat mediated antigen retrieval* oder *heat induced epitope retrieval (HIER)*), die „schonender“ für das Gewebe und auf weitaus mehr verschiedene Antigene anwendbar sind. Diese Methode wurde erstmals von Shi et al. 1991 beschrieben und von Suurmeijer 1994 durch den Einsatz von Citrat-Puffer verfeinert. Heute kommen neben dem Citrat-Puffer EDTA-Puffer, Tris-Puffer und Kombinationen mit unterschiedlichen pH-Werten als sog. Retrieval-Lösungen zum Einsatz. Die in der Lösung vollständig eingebetteten Objektträger werden bei der Hitzebehandlung über einen definierten Zeitraum (meist 10 bis 60 Minuten) bei 95-99 °C inkubiert. In dieser Arbeit wurde primär 1-molares NaCitrat (pH 6,0) verwendet (zur Untersuchung auf c-fos aber auch EDTA und Trypsin 0,1%) und das gesamte Material in einer handelsüblichen Mikrowelle bei 700W für 30 Minuten erhitzt.

#### 2.2.2.5.5. Reduktion von Hintergrundfärbung

Ein Problem der Immunhistologie ist das Auftreten einer unspezifischen Hintergrundfärbung, die die Darstellung des eigentlich gesuchten Antigens stark beeinträchtigen kann. Als wesentlich sind hierbei hydrophobe, ionische und elektrostatische Wechselwirkungen sowie endogene Enzymaktivitäten zu nennen. Zur Reduktion der hydrophoben Wechselwirkungen kamen Tris-basierte Waschpuffer mit und ohne Tween-Detergenz zum Einsatz (*TBS* bzw. *TNT*) zum Einsatz. Die Antikörper wurden ihrerseits mittels kommerziell erhältlichem Antibody Diluent der Firma Dako verdünnt. Vor dem erstmaligen Aufbringen der Antikörperlösungen wurde zudem eine 4%ige Milchpulverlösung als Proteinblock eingesetzt (Proteine konkurrieren mit den IgG um die hydrophoben Bindungsstellen).

#### 2.2.2.5.6. Antikörper/-verdünnungen und verwendete Protokolle

Vor dem Aufbringen des verdünnten Antikörpers wurde das histologische Präparat auf dem Objektträger mit einem wasserabweisenden Fettstift (Dako Pen) eingekreist, wodurch sich die

aufzutragende Menge an Antikörperlösungen, Block-Reagenzien etc. auf ca. 100µl pro Präparat und Schritt reduzieren ließen. Die Inkubation erfolgte in der Feuchtkammer entweder bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht im Kühlschrank bei 4-8°C (KT). Die verwendeten Antikörper und -verdünnungen sind in **Tab. 2.2** festgehalten.

### Protokoll c-kit-TSA-Alexa568 + Cx43-FITC (Doppelfärbung)

1. Entparaffinieren	3 x 15 min	Xylol I, II, III
2. Absteigende Alkoholreihe	3 x 5 min	100%, 96%, 70% Ethanol
3. Rehydrieren	5 min	Aqua dest.
4. Waschen	10 min	TBS (1x; pH 7,6)
5. Antigendemaskierung	30 min	in NaCitrat (0,01M, pH 6,0) bei 700 W in der Mikrowelle
6. Abkühlen	30 min	im Glas stehen lassen
7. Waschen	10 min	TBS
8. Blocken	1 h	4% Milch/TBS bei RT
9. primäre AK	über Nacht	in Feuchtkammer bei KT
<i>gt-α-c-kit, Santa Cruz, sc-168</i>		1:50 in DAKO Anti-
+ <i>ms-α-Cx43, Chemicon, mab 3068</i>		1:100 body-Diluent
10. Waschen	3 x 5 min	TNT
11. Blocken	30 min	TNB*
12. sekundäre AK	1 h	bei RT
<i>rb-α-gt-POD, Sigma, 5420</i>		1:40 in TNB*
+ <i>rb-α-ms-FITC, Dako, F0261</i>		1:32 in TNB*
13. Waschen	3 x 5 min	TNT
14. <i>Tyramid (biotinyliert)</i> *	10 min	1:50 in Amplific Diluent*
15. Waschen	3 x 5 min	TNT
16. <i>Streptavidin/Alexa 568</i>	30 min	1:50 in TNB*
17. Waschen	2 x 5 min	TNT
	1 x 5 min	Aqua dest.
18. Kerngegenfärbung mit DAPI	5 min	0,05 µg/ml in Aqua dest.
19. Waschen	5 min	Aqua dest.
20. Eindeckeln mit Dako Fluorescence Mounting Medium		

\*) Tyramid (biotinyliert), TNB und Amplific Diluent sind Bestandteile des TSA-Biotin-Kits NEL700 von Perkin Elmer und nach dort beschriebenen Protokollen hergestellt.

Für die tyramidverstärkte Färbung von NF- $\kappa$ B wurde in Schritt 9 statt des *ms- $\alpha$ -Cx43*-Antikörpers ein *ms- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B*-Antikörper 1:50 (Santa Cruz, sc 8008) verwendet. Dann erfolgte die Inkubation mit nur einem Sekundärantikörper, und zwar *rb- $\alpha$ -gt-POD* 1:40 (Sigma, 5420) gegen den c-kit-Primärantikörper und schließlich die Tyramidfärbung mit in diesem Fall *Streptavidin/Alexa 488* 1:50. Nach ausgiebigem Waschen wurden dann die Schritte 12 bis 16 nochmals wiederholt, in diesem Fall mit dem Sekundärantikörper *rb- $\alpha$ -ms-POD* 1:200 (Sigma A-9044) gegen den NF- $\kappa$ B-Primärantikörper und *Streptavidin/Alexa 568* 1:50. Die Schritte 17 bis 20 wurden wie üblich durchgeführt.

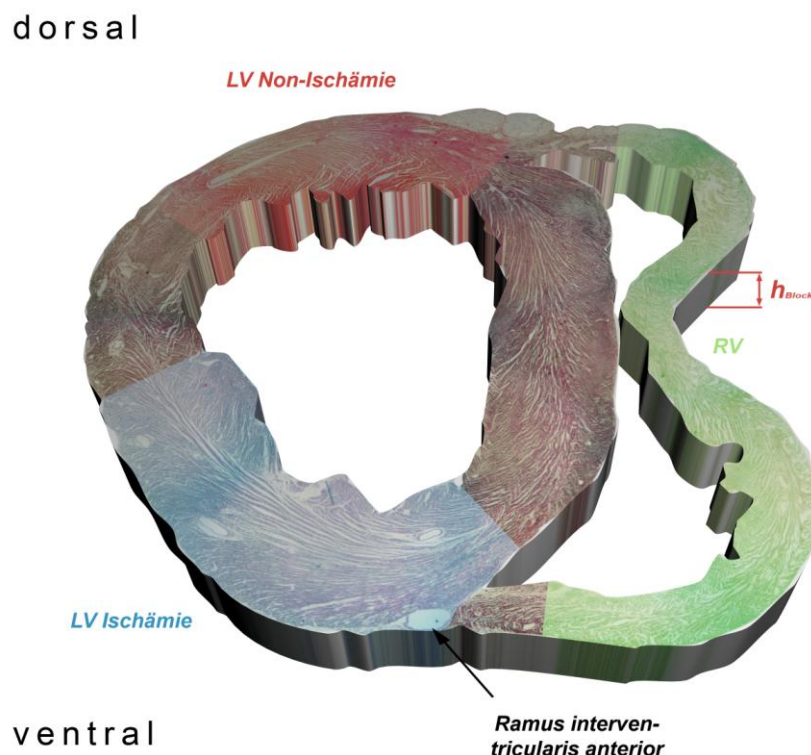
### 2.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenz- wie auch die Lichtmikroskopie wurden an einem Axioplan 2 der Firma Zeiss durchgeführt. Die Bilderfassung erfolgte dabei digital über die integrierte AxioCam mit Übermittlung an einem herkömmlichen PC, auf dem die zugehörige Software Axiovision zum Einsatz kam. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Einsatz von Fluorochromen als optische Signalgeber. Ein Fluorochrom wird durch Licht einer bestimmten Frequenz spezifisch aktiviert, indem Elektronen durch das absorbierte Licht in ein energiereicheres Orbital gehoben werden, von dem sie nach wenigen Nanosekunden erneut zurückfallen und die nun freiwerdende Energie als ein längerwelliges Licht wieder aussenden. Als Anregungslichtquelle kommt hierbei eine Lampe mit hoher Lichtintensität im Anregungswellenlängenbereich zum Einsatz (im konkreten Fall eine Xenon-Gasentladungslampe). Nach Bündelung über Kollimatorlinsen wird das Licht durch einen Anregungsfilter weiter in seinem Spektrum eingengt und über einen dichroitischen Spiegel über das Objektiv auf das Präparat gelenkt. Liegt hier ein Fluorochrom vor, was sich durch das beleuchtende Licht anregen lässt, so emittiert es wiederum Licht in einem engen Frequenzbereich (Beispiel Alexa488: Absorption bei 495nm, Emission bei 519nm). Dieses wird über das Objektiv auf den dichroitischen Spiegel zurück geleitet, der das Licht dieser Wellenlänge allerdings passieren lässt. Über den Emissionsfilter, der ebenfalls die Bandbreite des Lichtsignals einengt, gelangt es schließlich zum Okular, respektive der Kameraoptik mit Analog-Digital-Wandler. Durch den Einsatz verschiedener Sets von zusammengehörigen Anregungs- und Emissionsfiltern kann mit verschiedenen Fluorochromen gearbeitet werden. Über einen Filterrevolver können die Filtersets unmittelbar beliebig gewechselt werden, sodass von dem selben Bildausschnitt Aufnahmen mit unterschiedlichen Fluorochromen erstellt werden können, die dann abschließend digital

verarbeitet und idealerweise in einem Bild zusammengefasst werden können (nach "Romeis - Mikroskopische Technik", 18. Auflage, Heidelberg 2010).

#### 2.2.4. Bestimmung von Zellzahl und -verteilung c-kit+ BMC und c-kit+/Cx43+ BMC

Zunächst erfolgte eine Doppelfärbung auf c-kit (TSA, Alexa 568 - rot) und Cx43 (FITC-gelabelter Sekundärantikörper - grün) nach o.g. Protokoll. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte dann die Zählung c-kit+ Zellen unter 400-facher Vergrößerung in 3 definierten Arealen des Myokardquerschnittes. Diese Areale wurden beschrieben als *linksventrikulär ischämisch (LV Ischämie)*, *linksventrikulär nichtischämisch (LV Non-Ischämie)* und *rechtsventrikulär (RV)* (**Abb. 2.8**). Hierbei wurde die Ischämiezone entsprechend des Verlaufes des ligierten Gefäßes abgeschätzt. Die Zellzahl N wurde jeweils als Mittelwert aus 20 Gesichtsfeldern gebildet. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde das Präparat komplett durchgemustert und alle c-kit+ BMC gezählt und auf eine zusätzliche Positivität für Cx43 beurteilt.



**Abb. 2.8**  
HE-gefärbter Gewebeschnitt mit graphischer Markierung der linksventrikulären ischämischen (LV Ischämie)/ nicht-ischämischen (LV Non-Ischämie) und rechtsventrikulären (RV) Areale

### 2.2.5. Hochrechnung der Anzahl retinierter c-kit+ BMC durch Bestimmung der mittleren Zelldichte und Approximation des Myokardvolumens

Für die näherungsweise Berechnung c-kit+ BMC ausgehend von der Anzahl c-kit+ BMC pro Gesichtsfeld (s.o.) war zunächst die Bestimmung der Zelldichte im histologischen Präparat notwendig. Hierfür wurde zuerst die Myokardquerschnittsfläche des histologischen Schnittes bestimmt. Es war möglich, jeweils einen kompletten Querschnitt auf einen Objektträger aufzuziehen. Dieser wurde HE-gefärbt und anschließend mit der kleinsten Vergrößerung (1,25er Objektiv) unter dem Lichtmikroskop unter Einsatz von Zeiss Axiovision in mehreren Einzelbildern komplett fotografiert. In Photoshop Elements 2 wurden die Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt und in Zeiss Axiovision reimportiert. Mit dem Spline-Auswahlwerkzeug konnten die Konturen umrandet und mittels des integrierten Flächenberechnungsalgorithmus die Myokardfläche exakt berechnet werden (Skalierungsfaktor bei 1,25er Objektiv: 2,64µm/Pixel). Ein histologischer Schnitt entspricht mit seiner definierten Schnittdicke (in diesem Fall je 5µm) einem dreidimensionalen Körper. Zur Bestimmung der Zelldichte  $\rho$  wurde wiederum der Mittelwert der Zellzahl aller 3 Areale (*LV Ischämie*, *LV Non-Ischämie* und *RV*) bestimmt und durch die Gesichtsfeldfläche bei 400-facher Vergrößerung und die Dicke des Schnittes geteilt:

$$\rho = \frac{\overline{\varnothing N}}{\text{Gesichtsfeldfläche} \times \text{Präparatschichtdicke}} = \frac{\overline{\varnothing N}}{301907,05 \mu\text{m}^2 \times 5 \mu\text{m}}$$

Mit den so bestimmten Zelldichten konnte jeweils die Zellzahl pro Gewebsblock  $N_{\text{Block}}$  (vgl. **Abb. 2.8**) und pro gesamtem Herzen ( $N_{\text{Herz}}$ ) approximativ berechnet werden. Eine Berechnung der Zellzahl in Bezug auf die Gesamtgröße des Herzens macht insofern Sinn, als sowohl die Gewebsblöcke als auch die Herzen jeweils unterschiedlich groß waren. Einschränkend ist aber zu sagen, dass es sich hierbei um ein idealisiertes Modell handelt, bei dem die einzelnen Gewebsblöcke und auch das Gesamtherz jeweils mit konstanter Querschnittsfläche eingehen.

$$N_{\text{Block}} = V_{\text{Block}} \times \rho_{\text{Block}} = \text{Querschnittsfläche}_{\text{Block}} \times h_{\text{Block}} \times \rho_{\text{Block}}$$

$$N_{\text{Herz}} = h_{\text{Herz}} \times \frac{N_{\text{BlockA}} + N_{\text{BlockB}} + N_{\text{BlockC}} + N_{\text{BlockD}}}{h_{\text{BlockA}} + h_{\text{BlockB}} + h_{\text{BlockC}} + h_{\text{BlockD}}}$$

### **2.2.6. Erfassen aller c-kit+/NF-κB+ Zellen sowie Bestimmung des Anteils NF-κB-positiver Zellkerne im ischämischen und nicht-ischämischen linken Ventrikel**

Hierbei erfolgte eine doppelte tyramidverstärkte Färbung auf c-kit (Alexa 488 - grün) und NF-κB (Alexa 568 - rot) nach o.g. Protokoll. Die Zellkerne wurden mit ChicagoSkyBlue gefärbt. Es wurden exemplarisch zwei Gewebeschnitte pro Herz ausgewählt. Unter 400-facher Vergrößerung wurden die Präparate komplett nach c-kit+/NF-κB+ Zellen durchgemustert. In einem weiteren Schritt wurden in 6 Präparaten (eines exemplarisch für jedes Herz) jeweils in der *LV-Ischämie-Zone* und der *LV-Non-Ischämie-Zone* 6 Ausschnitte photographiert und die Aufnahmen in Photoshop Elements importiert. Hier wurde die Gesamtzahl aller c-kit- Zellkerne (also alle Myozyten, Fibrozyten, Endothelzellen etc.) pro Ausschnitt ermittelt. Nach Einblenden der Aufnahme der NF-κB+/c-kit- Zellkerne wurden diese ebenfalls gezählt.

### **2.2.7. Statistische Auswertung**

Die numerischen Daten wurden mittels Microsoft Excel 2007® aufgearbeitet. Alle Werte wurden als Durchschnitt  $\pm$ SEM angegeben. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz ungepaarter, nicht-parametrischer Messwerte wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$ , eine Tendenz für  $p < 0,1$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einfluss von Ischämie und Stammzellinfusion auf die myokardiale Funktion

Bei dem unter der Versuchsnummer 1710 durchgeführten Experiment zeigte sich bereits in der Äquilibrationsphase eine pathologisch geringe Kontraktilität des Herzens (dLVP 20mmHg, HF 90/min, RPP 1800mmHg/min) sowie gestörte Perfusion (CF 11ml/min) - das ganze a.e. auf dem Boden einer seit längerem bestehenden globalen Minderperfusion - weshalb dieser für die Berechnung der hämodynamischen Mittelwerte außer Acht gelassen wurde. Folglich wurde  $n=5$  definiert. Für die histologische Aufarbeitung wurde die Versuchsnummer trotzdem berücksichtigt, da dies offensichtlich keinen Einfluss auf die Zellretention hatte (67% Retention vs. MW 73% ( $\pm 4\%$ ), vgl. **Tab. 3.2**).

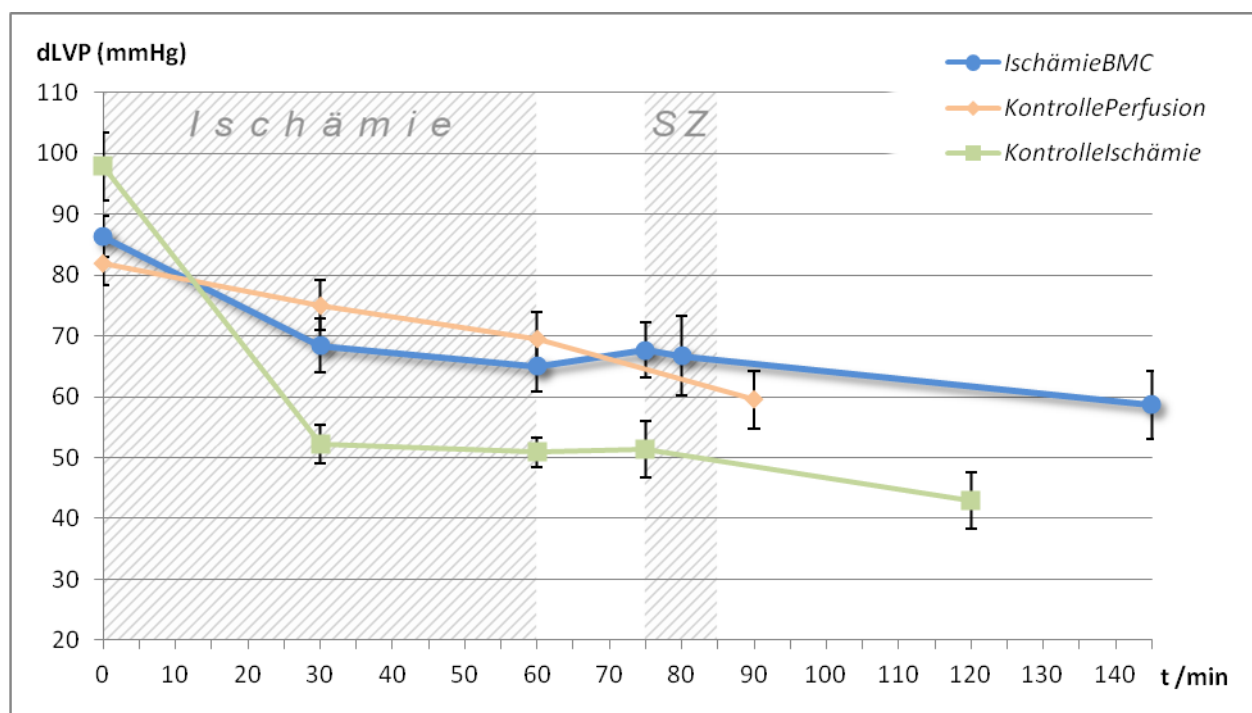
Während des Langendorff-Versuches erfolgte zu den in **Abb. 2.3** im methodischen Teil dargestellten Zeiten die Bestimmung von EDP, LVP, BCL und CF. In der weiteren Betrachtung der Ergebnisse wurden anstelle von BCL die Herzfrequenz ( $HF = 60\text{sek/min} \cdot BCL^{-1}$ ) sowie der entwickelte linksventrikuläre Druck (dLVP) als relevante Parameter verwendet. Die Werte der Gruppe *IschämieBMC* sind übersichtsweise in **Tab. 3.1** dargestellt.

	0 min (Ende Äquilibration)	30 min (Ischämie)	60 min (Ischämie)	75 min (1. Reperf.)	80 min (BMC-Infusion)	145 min (2. Reperf.)
<b>LVP</b> (mmHg)	99,0 ( $\pm 8,52$ )	84,0 ( $\pm 7,33$ )	81,3 ( $\pm 8,00$ )	89,3 ( $\pm 8,52$ )	86,0 ( $\pm 9,21$ )	78,7 ( $\pm 6,52$ )
<b>dLVP</b> (mmHg)	86,3 ( $\pm 3,35$ )	68,3 ( $\pm 4,41$ )	65,0 ( $\pm 4,08$ )	67,7 ( $\pm 4,52$ )	66,7 ( $\pm 6,5$ )	58,7 ( $\pm 5,64$ )
<b>CF</b> (ml/min)	26,0 ( $\pm 1,26$ )	20,6 ( $\pm 1,60$ )	19,2 ( $\pm 1,16$ )	21,2 ( $\pm 1,39$ )	19,4 ( $\pm 1,78$ )	17,6 ( $\pm 2,42$ )
<b>HF</b> (min <sup>-1</sup> )	142,6 ( $\pm 9,43$ )	136,2 ( $\pm 11,65$ )	130,0 ( $\pm 11,79$ )	138,6 ( $\pm 11,91$ )	128,0 ( $\pm 12,7$ )	130,6 ( $\pm 13,46$ )
<b>RPP</b> (mmHg/min)	12233 ( $\pm 666$ )	9136 ( $\pm 445$ )	8280 ( $\pm 374$ )	9196 ( $\pm 717$ )	8249 ( $\pm 540$ )	7396 ( $\pm 440$ )
<b>relCF</b> (ml/mmHg)	$2,14 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,31 \times 10^{-5}$ )	$2,24 \times 10^{-3}$ ( $\pm 9,58 \times 10^{-5}$ )	$2,27 \times 10^{-3}$ ( $\pm 5,95 \times 10^{-5}$ )	$2,34 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,74 \times 10^{-5}$ )	$2,41 \times 10^{-3}$ ( $\pm 2,04 \times 10^{-4}$ )	$2,35 \times 10^{-3}$ ( $\pm 2,22 \times 10^{-4}$ )

**Tab. 3.1** Mittelwerte der gemessenen hämodynamischen und abgeleiteten Parameter der Versuchsreihe *Ischämie-BMC* für  $n=5$ : LVP...maximaler linksventrikulärer Druck, dLVP...entwickelter linksventrikulärer Druck, CF...Koronarfluss, HF...Herzfrequenz, RPP...rate pressure product, relCF...relativer Koronarfluss; Standardfehler SEM in Klammern

### 3.1.1. Entwickelter linksventrikulärer Druck

Der entwickelte linksventrikuläre Druck (dLVP) berechnet sich als Differenz aus LVP und EDP und ist ein Maß für die Kontraktilität des Myokards unter Berücksichtigung der enddiastolischen Wandspannung. Er korreliert mit dem myokardialen Sauerstoffverbrauch respektive -angebot. In allen drei Gruppen war über die Zeit gesehen tendenziell ein Abfall der Kontraktilität zu beobachten. In der *KontrolleIschämie* zeigte sich während der Ligatur des RIVA eine überdurchschnittliche Abnahme der Kontraktilität, die nach Wiedereröffnung der Ligatur zunächst sistierte und sich schließlich dem allgemeinen Trend wieder annäherte. Die Gruppe *IschämieBMC* wies zunächst einen analogen Abfall der Kontraktilität, dann nach Ligatureröffnung einen Anstieg der Kontraktilität auf. Die Infusion der Stammzellen (Minute 75 bis 85) hatte indes keinen Einfluss auf die Kontraktilität (**Abb. 3.1**).



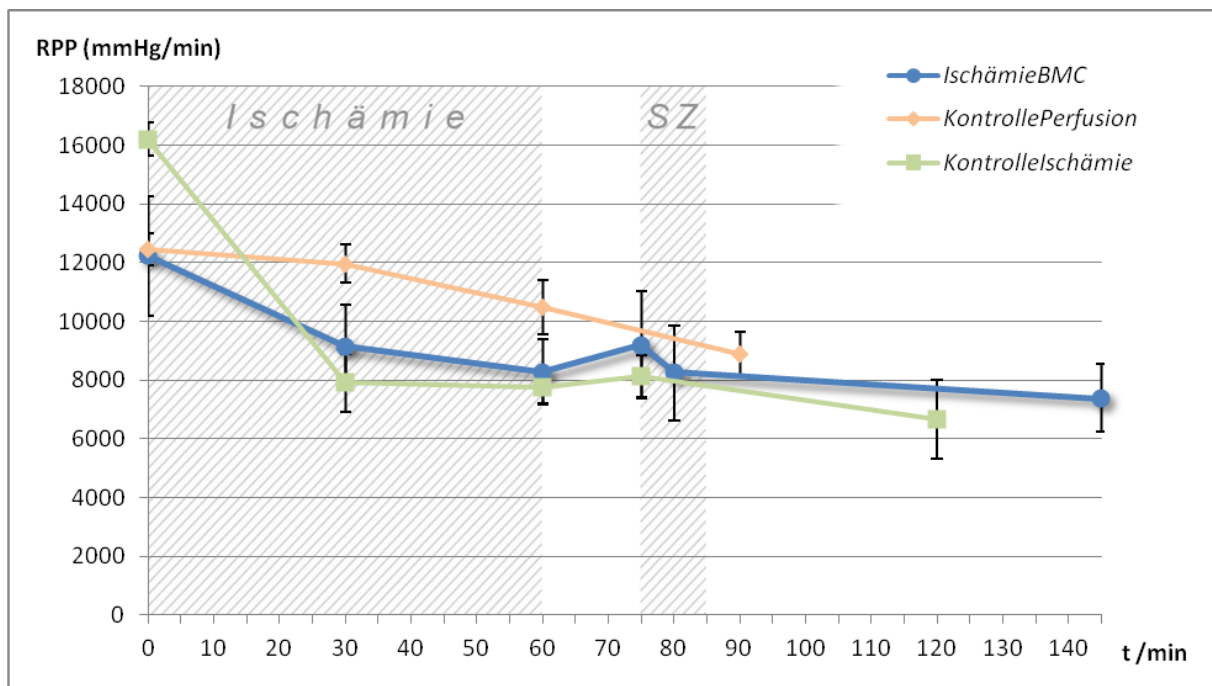
**Abb. 3.1** Entwickelter linksventrikulärer Druck (dLVP)

### 3.1.2. Rate pressure product

Das rate pressure product (RPP) als Produkt aus entwickeltem linksventrikulärem Druck und Herzfrequenz ( $dLVP \cdot HF$ ) ist ein Maß für die Arbeit des linksventrikulären Myokards und korreliert (mehr noch als der entwickelte linksventrikuläre Druck) mit dem myokardialen Sauerstoffverbrauch und -angebot (Nelson et al. 1974). In der *KontrollePerfusion* fiel das



RPP über die Zeit kontinuierlich ab. Sowohl in *IschämieBMC* als auch in *KontrolleIschämie* ließen sich in der Ischämiephase eindeutig ein tendentiell stärkerer Abfall des RPP nachweisen, welcher die o.g. Korrelation zum myokardialen Sauerstoffangebot bestätigt. Nach Beendigung der Ischämie mit Wiedereröffnung der Ligatur war in beiden Gruppen ein erneuter Anstieg des RPP zu verzeichnen, wobei dies in der *IschämieBMC* geringfügig deutlicher ausfiel. Im weiteren Verlauf kam es in den Ischämiegruppen, identisch zur *KontrollePerfusion*, zu einem kontinuierlichen Abfall des RPP.

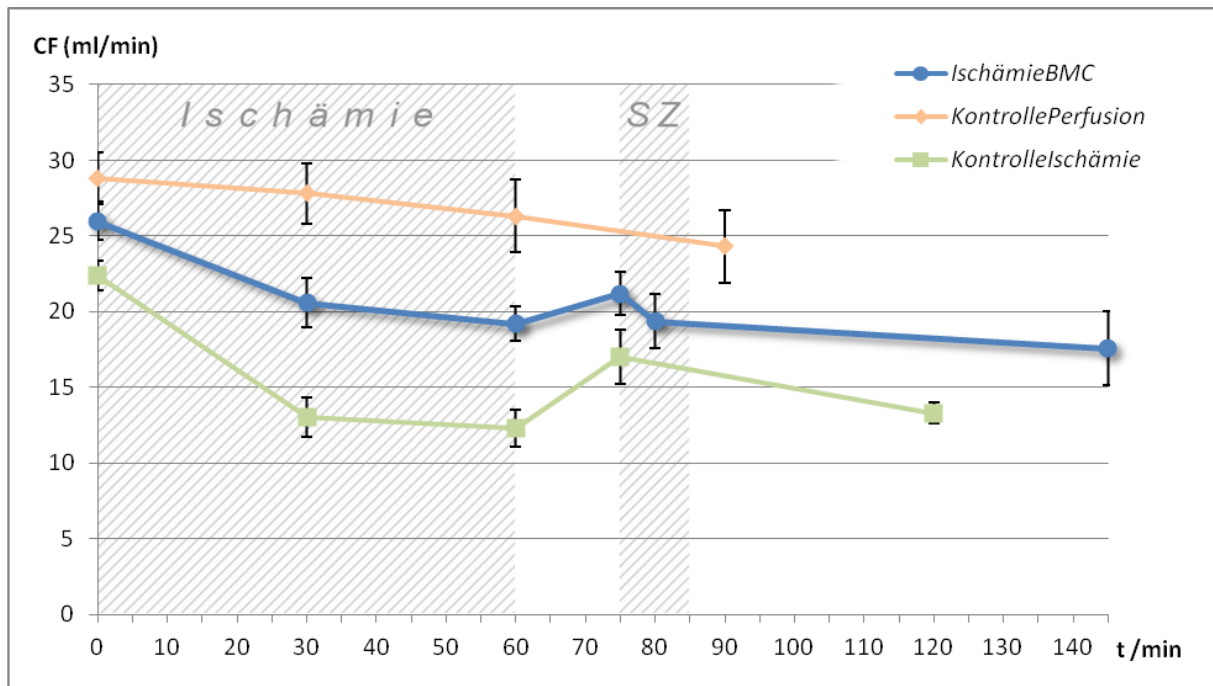


**Abb. 3.2** Rate pressure product (RPP)

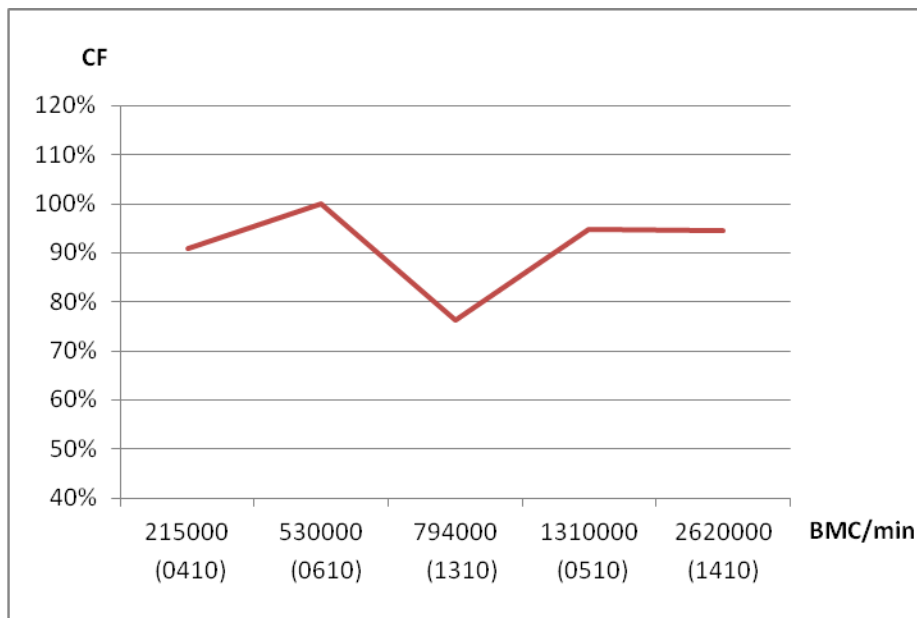
### 3.1.3. Koronarer Fluss

Der koronare Fluss korreliert im druckkonstanten Langendorff-System indirekt mit dem Koronargefäßwiderstand. In beiden *Ischämie*-Gruppen zeigte sich eine transiente Abnahme des Koronarflusses (*IschämieBMC* 26%, *KontrolleIschämie* 45%), bedingt durch die vorübergehende Ligatur mit Ausschaltung eines Gefäßabschnittes und dadurch Erhöhung des Widerstandes. Die sukzessive Abnahme des Koronarflusses während der Reperfusionsphase respektive späten Versuchsphase fand sich in allen 3 Versuchsgruppen (Abfall nach 120 Minuten um: *IschämieBMC* 29%, *KontrollePerfusion* 21%, *KontrolleIschämie* 41%). Während der Stammzellinfusion kam es kurzfristig zu einem deutlichen Abfall des Koronarflusses (7% vom Ausgangswert innerhalb von 5 Minuten), allerdings schloss sich der Koronarfluss an-

schließlich wieder dem allgemeinen Trend an (**Abb. 3.3**). Die Anzahl der pro Minute infundierten BMC hatte auf die Veränderung des Koronarflusses keinen Einfluss (**Abb. 3.4**).



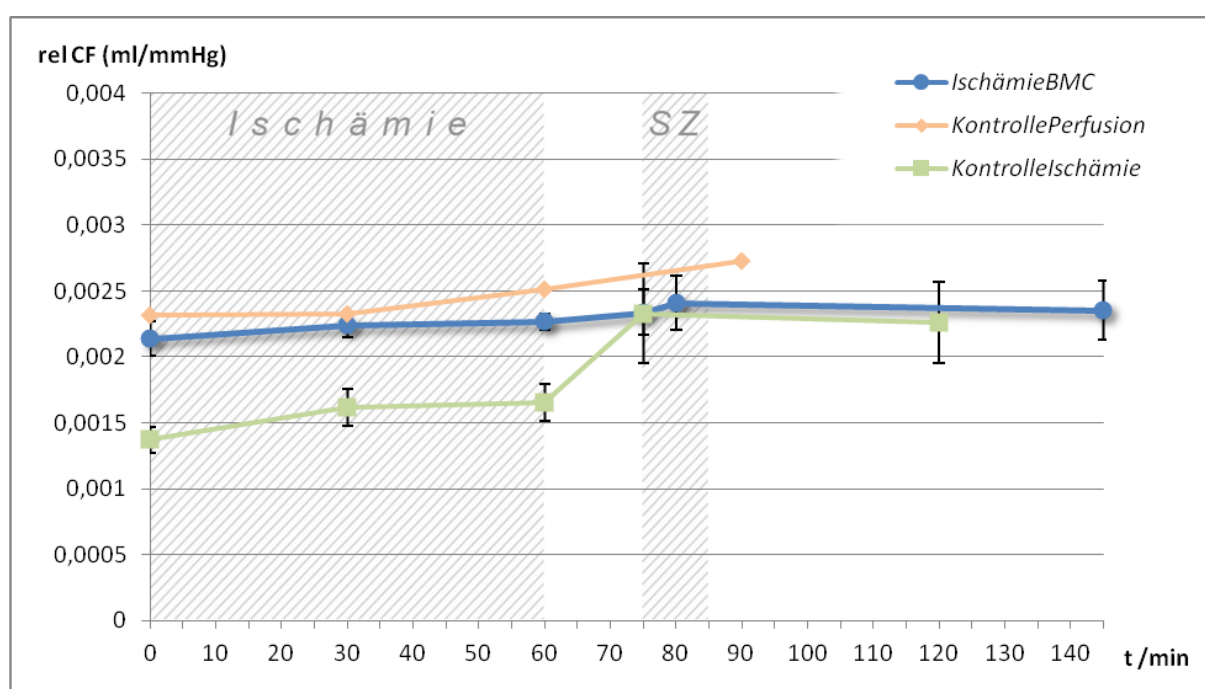
**Abb. 3.3** Koronarfluss (CF)



**Abb. 3.4** Koronarfluss (CF) während der BMC-Infusion als Prozent vom Ausgangswert in Abhängigkeit von der Anzahl infundierter BMC

### 3.1.4. Relativer Koronarfluss

Der relative Koronarfluss (**Abb. 3.5**) stellt den auf das rate-pressure product (RPP) normalisierten Koronarfluss dar. Analog der Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen myokardialer Perfusion und geleisteter Herzarbeit besteht (Nelson et al. 1974), sollte relCF im zeitlichen Verlauf nahezu konstant bleiben. In der *KontrollePerfusion* zeigt sich ein leichter Anstieg von relCF, was auf einen etwas stärkeren Abfall von RPP im Vergleich zu CF hinweist und als Ausdruck einer zunehmend verschlechterten Sauerstoffverwertung gesehen werden kann. Ähnlich verhält sich auch die Versuchsgruppe *IschämieBMC*. In der *KontrolleIschämie* lässt sich ein sprunghafter Anstieg von relCF nach Ligatureröffnung zeigen, d.h. trotz restituiertem Koronarfluss steigt das RPP nicht gleichsinnig an. Dies kann mit einer ausgeprägten Randzonenhyperämie, aber auch mit einer bereits fortgeschrittenen myokardialen Infarzierung begründet werden. Zudem fällt eine größere Streubreite der Messwerte auf.



**Abb. 3.5** Relativer Koronarfluss (relCF)

### 3.1.5. EKG-Mapping

Mit Ausnahme von Versuch 1710 ließen sich in allen Versuchen typische ST-Streckenveränderungen während der Ischämiephase nachweisen, welche sich in der Reperfusionsphase regredient zeigten. Während und nach der Stammzellinfusion traten keine relevanten Arrhythmien auf.

## 3.2. Auswertung Zellzählung

### 3.2.1. Retention der infundierten BMC während des Langendorff-Versuches

Die Gesamtzahl der BMC wurde sowohl vor der Infusion als auch im Effluat erfasst. Daraus ließ sich nach der im methodischen Teil erwähnten Formel die Zellretention berechnen, welche im Mittel bei 73% (SEM  $\pm 4\%$ ) lag (n=5). Die extrakardiale Zellretention (d.h. in Glas- und Schlauchsystem verbliebene BMC) wurde durch sparsamen Materialeinsatz so gering wie möglich gehalten, eine Quantifizierung erfolgte jedoch nicht. Bei identischer Versuchsanordnung ist die extrakardiale Retention als systematischer Fehler in allen Versuchsreihen allerdings nicht maßgeblich für die Vergleichbarkeit der Daten. Der Versuch 0410 wurde aufgrund des ausgeprägt negativen Ausreißens bei Verdacht auf methodische Fehler aus der Mittelwertberechnung entfernt (**Tab 3.2**). Im Durchschnitt waren 94% (SEM  $\pm 1\%$ ) der Zellen vital (n=5).

Versuch	Infusion abs. (Zellen)	Vitalität (%)	Effluat (Zellen/ml)	CF (ml/min)	Retention abs. (Zellen)	Retention rel. (%)
(0410)	(2150000)	(80)	(10000)	(20)	(150000)	(7%)
0510	13100000	98	26700	18	8294000	63%
0610	5300000	93	5700	26	3818000	72%
1310	7940000	91	11250	16	6140000	77%
1410	26200000	92	23750	17	22162500	85%
1710	9425000	95	35000	9	6275000	67%
<b>MW (n=5)</b>	<b>12,39x10<sup>6</sup></b>	<b>94</b>	<b>20480</b>	<b>17</b>	<b>9,34x10<sup>6</sup></b>	<b>73%</b>
<b>SEM (n=5)</b>	<b><math>\pm 3,67 \times 10^6</math></b>	<b><math>\pm 1</math></b>	<b><math>\pm 5310</math></b>	<b><math>\pm 3</math></b>	<b><math>\pm 3,28 \times 10^6</math></b>	<b><math>\pm 4\%</math></b>

**Tabelle 3.2** Retention der infundierten BMC im Langendorff-Versuch

### 3.2.2. Histologische Wiederfindungsrate der infundierten c-kit+ BMC

Um nach der Bestimmung der Gesamtretention zu erfassen, wieviele Zellen im Herz retiniert wurden, erfolgte eine immunhistologische Aufarbeitung durch Markierung der BMCs mit einem gegen das Oberflächenmolekül *c-kit* gerichteten Primärantikörper. Anhand morphologischer Kriterien konnten die infundierten c-kit+ BMC von den kleineren, ebenfalls c-kit+ kardialen Stammzellen differenziert werden. Der Anteil c-kit+ BMC am Gesamtgut der BMC

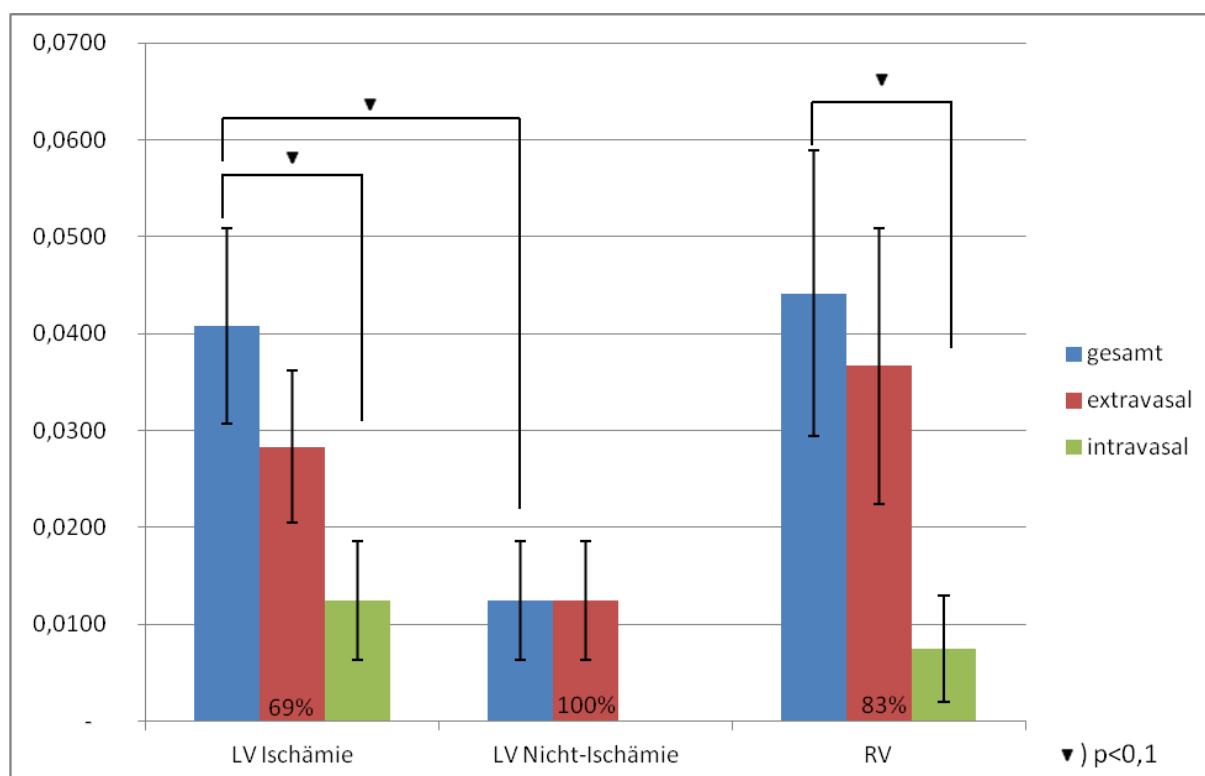
beträgt 2-4% (Dimmeler und Zeiher 2009) und wird in diesem Versuch mit einem approximateden Wert von 3% angenommen. In der histologischen Aufarbeitung konnten nun angenähert 16,3% (SEM  $\pm 2,1\%$ ) der infundierten c-kit+ BMC wiedergefunden werden (n=5, auch hier ohne Versuch 0410, **Tab. 3.3**). Das hierfür verwendete Rechenmodell ist im Detail im methodischen Teil beschrieben.

Versuch	BMC gesamt	c-kit+ BMC infundiert	c-kit+ BMC histol. gefunden	c-kit+ BMC infundiert/ gefunden
(0410)	(2150000)	(64500)	(42245)	(65,5%)
0510	13100000	393000	63461	16,2%
0610	5300000	159000	26097	16,4%
1310	7940000	238200	52057	21,9%
1410	26200000	786000	68752	8,8%
1710	9425000	282750	51651	18,3%
<b>MW (n=5)</b>	<b>12,39x10<sup>6</sup></b>	<b>371790</b>	<b>52404</b>	<b>16,3%</b>
<b>SEM (n=5)</b>	<b><math>\pm 3,67 \times 10^6</math></b>	<b><math>\pm 110243</math></b>	<b><math>\pm 7356</math></b>	<b><math>\pm 2,14\%</math></b>

**Tabelle 3.3** Histologische Wiederfindungsrate c-kit+ BMC

### 3.2.3. Räumlichkeitsverteilung der transplantierten c-kit+ BMC im ischämischen und nichtischämischen linksventrikulären sowie rechtsventrikulären Myokard

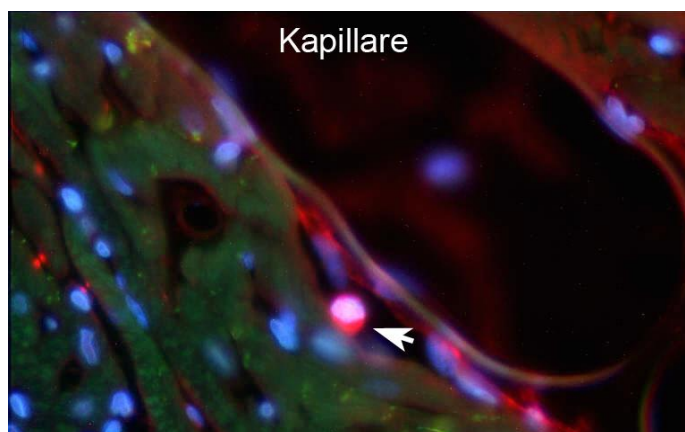
Im histologischen Schnitt wurden drei Zonen definiert: die Ischämiezone und eine Vergleichszone (Non-Ischämiezone) im linken Ventrikel sowie der rechte Ventrikel. Hierbei wurde die Ischämiezone entsprechend des Verlaufes des ligierten Gefäßes abgeschätzt. Es erfolgte die Auszählung von 20 Gesichtsfeldern pro histologischem Schnitt bei 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufgrund einer myokardialen Dysfunktion noch vor Initiierung der Ischämie wurde der Versuch 1710 nicht in die histologische Beurteilung integriert (n=5, mit je 4 histologischen Schnitten). Zusätzlich wurde eine Unterteilung nach extra- und intravasalem Zellverteilungsmuster durchgeführt. Die Gesamtzahl pro Gesichtsfeld im ischämischen linken Ventrikel im Vergleich zum nicht-ischämischen linken Ventrikel war tendenziell, aber nicht signifikant höher ( $p < 0,1$ ). Im Vergleich zum rechten Ventrikel lag kein Unterschied vor. Bei alleiniger Betrachtung der linksventrikulär extravasal wiedergefundenen Zellen zeigte sich ein 2,3-fach erhöhter Anteil in der Ischämiezone ohne ein statistisch relevantes Niveau zu erreichen ( $p = 0,17$ ; **Abb. 3.6**).



**Abb. 3.6:** Anzahl c-kit+ BMC pro Gesichtsfeld incl. Verteilungsmuster extra- und intravasal

### 3.2.4. Extravasale vs. intravasale Zellverteilung

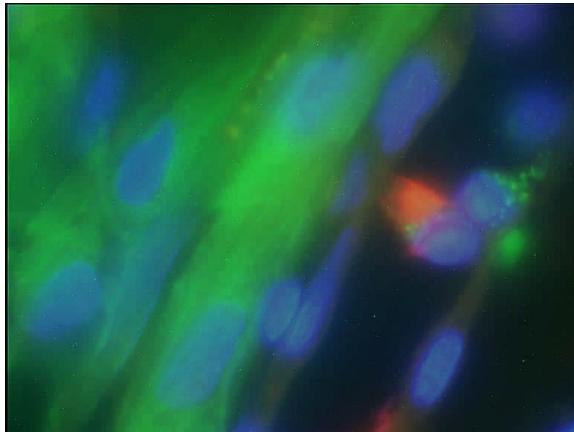
Bei Betrachtung des Zellverteilungsmusters zwischen Intra- und Extravasalraum fanden sich in der LV-Ischämiezone 69%, in der LV-Nicht-Ischämiezone 100% und im rechten Ventrikel 83% der Gesamtzellen extravasal wieder. Bezogen auf die initial vollständig intravasal applizierten Zellen verblieben in allen Myokararealen jeweils tendentiell weniger Zellen intravasal ( $p < 0,1$ ) (Abb 3.6).



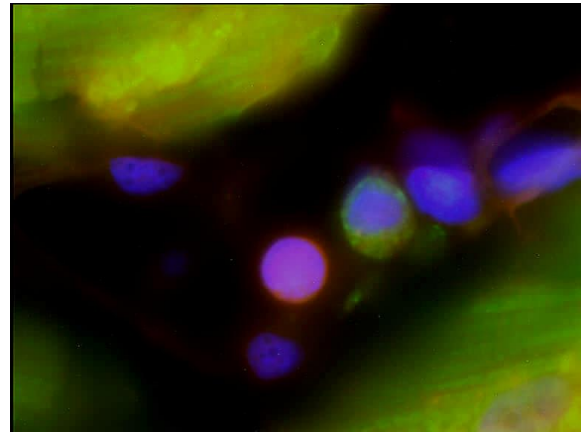
**Abb. 3.7** Beispiel für extravasal liegende c-kit+Zelle (Alexa568, rot, Pfeil), Connexin43 gelbgrün (FITC), Zellkerne blau (DAPI), Aktin grün

### 3.3. Connexin43-positive BMC

Nach Doppelfärbung auf c-kit und Connexin43 erfolgte eine Komplettmusterung aller histologischer Präparate bei 400-facher Vergrößerung (n=24). Insgesamt wurden hierbei 245 c-kit+ BMC identifiziert, wovon wiederum 4 (1,6%) zusätzlich positiv für Connexin43 waren. Der Unterschied zwischen c-kit+/Cx43+ BMC und c-kit+/Cx43- BMC war nicht signifikant ( $p>0,1$ ).



**Abb. 3.8** c-kit+ BMC (Alexa 568, rot) mit cytoplasmatischem Cx43+ Signal (FITC, grün) (c-kit+/Cx43+), benachbart eine c-kit-/Cx43+ Zelle; Zellkerne blau (DAPI)



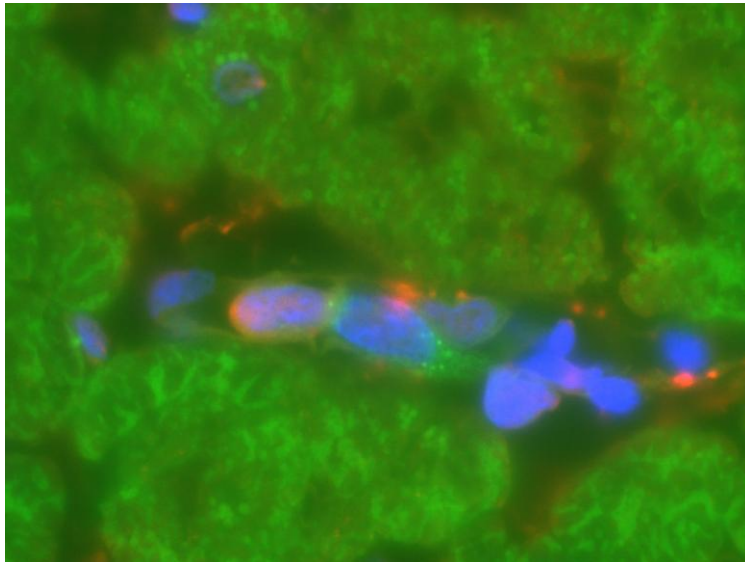
**Abb. 3.9** c-kit+/Cx43-Zelle (Alexa569, rot) mit benachbarter c-kit-/Cx43+ Zelle (Cx43 FITC, grün); Zellkerne blau (DAPI)

Nebenbefundlich fanden sich vereinzelt c-kit-negative Zellen mit positiver Anfärbbarkeit für Connexin43. Eine weitere Differenzierung erfolgte hierbei jedoch nicht.

### 3.4. NF- $\kappa$ B-positive BMC

Es wurden insgesamt 12 Präparate (n=12, jeweils die Gewebsblöcke B und C aller 6 Herzen) untersucht. Bei qualitativer Betrachtung waren in allen Präparaten sowohl c-kit+ Zellen, als auch NF- $\kappa$ B+ Zellen nachweisbar. Es fanden sich jedoch keine Zellen, die eine doppelte Anfärbbarkeit aufwiesen. Zu beachten ist, dass NF- $\kappa$ B durch Alexa 568 (rot) und c-kit durch Alexa 488 (grün) nach TSA-Protokoll gefärbt wurden.



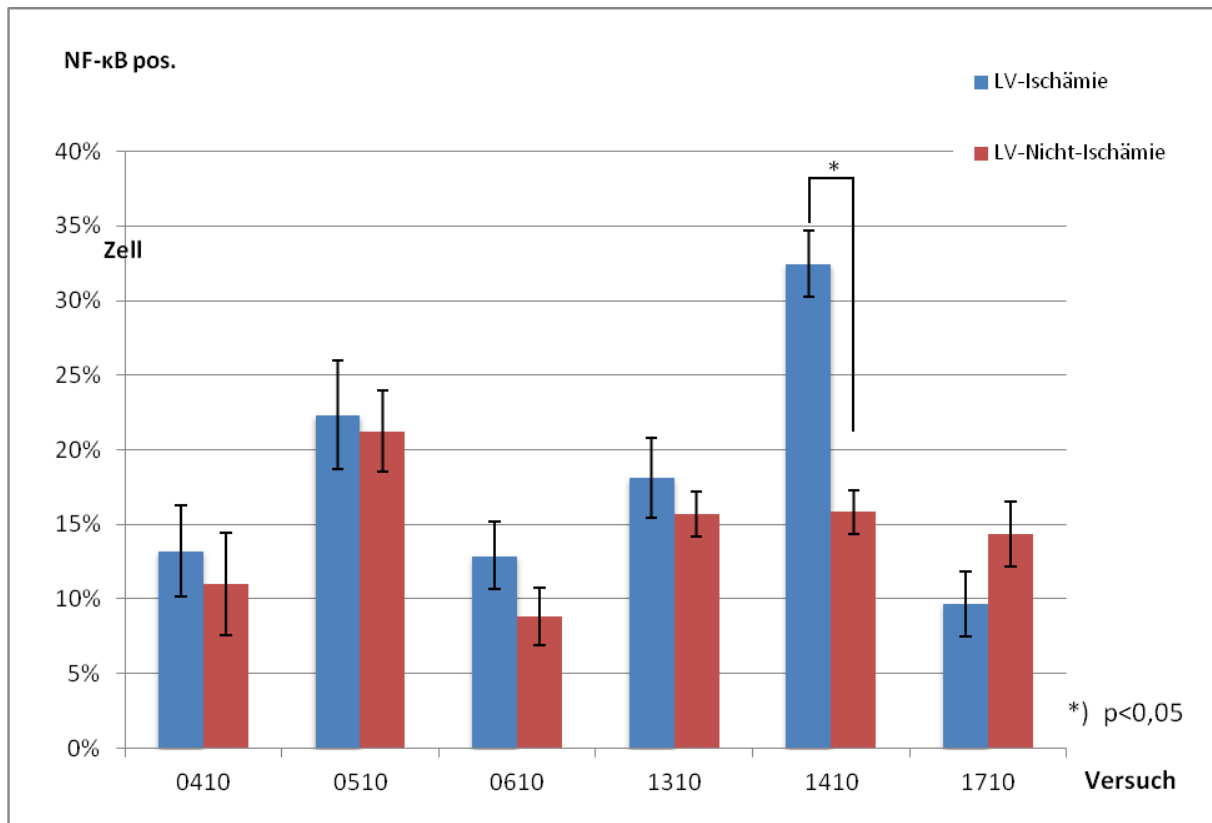


**Abb. 3.10** NF- $\kappa$ B (Alexa 568, rot) in c-kit-neg. Zelle, Nachbarzelle c-kit-pos (Alexa 488, grün) und NF- $\kappa$ B-negativ; Zellkerne blau; NB: starke grüne Hintergrundfluoreszenz durch Aktin

### 3.5. NF- $\kappa$ B-positive myokardiale Zellen

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurde untersucht, wie groß der Anteil NF- $\kappa$ B positiver Zellkerne im ischämischen und nicht-ischämischen Myokard ist. Die myokardialen Zellkerne sind durch ihre gestreckte und unsegmentierte Form von mononukleären Zellen leicht abgrenzbar. Exemplarisch wurde je ein Gewebsschnitt pro Versuchsherz untersucht. Eine Differenzierung hinsichtlich Endothelzellen, Fibroblasten oder Kardiomyozyten erfolgte in dieser Analyse nicht. Hierbei fanden sich - mit Ausnahme von Versuch 1710 - in allen Präparaten stets mehr NF- $\kappa$ B-positive Zellkerne in den ischämischen als in den nicht-ischämischen Bereichen. Der Unterschied war für Versuch 1410 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) (**Abb. 3.11**). Versuch 1710 indes war bereits mit Beginn des Langendorff-Versuches durch einen abnorm niedrigen entwickelten linksventrikulären Druck aufgefallen, sodass hier möglicherweise bereits vor Ischämie und Stammzellinfusion eine Kardiomyopathie/Myokardschaden vorgelegen haben könnte, was bei Betrachtung der Histologie berücksichtigt werden muss (vgl. Diskussion).





**Abb. 3.11** Anteil NF-κB-positiver Zellkerne pro Gesichtsfeld

### 3.6. Anzahl c-kit+ und c-fos+ Zellen

Bei exemplarischer Anfärbung der histologischen Präparate 1410B & C sowie 1710B & C mit sowohl unterschiedlichen Inkubationszeiten für den c-fos-Primärantikörper von 24, 48 und 72h als auch unterschiedlichen Verfahren der Antigendemaskierung mit NaCitrat, EDTA oder Trypsin 0,1%, ließ sich für keines der Protokolle eine spezifische Anfärbung myokardialer oder mononukleärer Zellen erreichen. Ein weiterer Versuch mit einem biotinylierten und tyramid-verstärkten Sekundärantikörper nach dem bereits beschriebenen Protokoll konnte ebenfalls keine spezifische Anfärbung für c-fos zeigen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Einfluss der Stammzellinfusion auf rhythmogene Stabilität und Hämodynamik in der frühen Reperfusionsphase

Veränderungen des zellulären Aktionspotentials während myokardialer Ischämie bereiten den Weg für maligne Arrhythmien durch intramurale Reentry-Mechanismen (Heusch 1990, Roskamm et al. 2004). Auch in der Reperfusionsphase nach Wiedereröffnung eines Gefäßverschlusses können, vor allem in den ersten 48 Stunden, atriale und ventrikuläre Reperfusionsarrhythmien auftreten. Die bisherigen Stammzellstudien nach Myokardinfarkt führten die Stammzellinfusion frühestens am dritten Postinfarkttag durch – bis auf eine Ausnahme, bei der dies nach 3 Stunden erfolgte (Ge et al. 2006). In keiner der Studien wurden während oder nach der Stammzellinfusion relevante kardiale Arrhythmien beobachtet. In der hier vorgelegten experimentellen Arbeit erfolgte die Stammzellinfusion bereits 15 Minuten nach Beendigung der akuten Ischämie, und auch hier konnten keine proarrhythmogenen Effekte der Stammzellinfusion gesehen werden. Eine mögliche Ursache kann darin liegen, dass die Stammzelllösung auf Grundlage der Tyrodelösung sehr inert ist und somit weder relevante Veränderungen der Elektrolytzusammensetzung noch des pH-Wertes auftraten, welche zu Veränderungen der Zellpotentiale hätten führen können: durch die wiederholten Waschschrte während der Zellaufbereitung lag eine hochreine Zellsuspension vor, und auch der hohe Anteil vitaler BMC (94%) spricht für eine hohe Stabilität der korpuskulären Bestandteile und somit gegen potentielle akute Elektrolytverschiebungen durch "Hämolyse". Da, wie weiter unten ausgeführt, zudem keine nennenswerte myokardiale Ischämie während der Stammzellinfusion zu verzeichnen war, spielte diese ebenfalls keine Rolle als Arrhythmietrigger. Anzumerken ist jedoch, dass in allen 3 Langendorff-Gruppen (*IschämieBMC*, *KontrolleIschämie* und *KontrollePerfusion*) weder während der akuten Ischämie noch in der (Re)-Perfusion relevante Rhythmusstörungen auftraten. Anders als bei Schweinen, wo bei proximalem RIVA-Verschluss in bis zu 100% schwere ventrikuläre Rhythmusstörungen auftraten (Hou et al. 2005), könnte eine naturgegebene Kollateralversorgung (Schaper et al. 1967) diesbezüglich protektiv gewirkt haben. Wie auch immer, selbst in den Versuchen an Schweinen traten während der eigentlichen Stammzellinfusion keine arrhythmogenen Ereignisse auf (Hou et al. 2005, Freymann et al. 2006).

Neben der rhythmogenen Instabilität kommt es im Rahmen einer myokardialen Ischämie zusätzlich zu einer Funktionseinschränkung der Myozyten mit nachfolgender Reduktion von

regionaler und/oder globaler Kontraktilität. Als mögliche Folge treten Symptome des kardialen Vorwärts- (low-output) und Rückwärtsversagens (Kongestion) auf. Die Maximalform stellt der kardiogene Schock dar. Häufig letal endet die Ruptur von nekrotischem Myokard. Nicht zwangsläufig kommt es unter ischämischen Bedingungen zur Ausbildung einer Nekrose. Entscheidend hierfür mögen einerseits Prozesse präischämischer Konditionierung, z.B. durch repetitive Ischämien oder Training (Marangiu und Crisafulli 2014) oder der Ausbildung eines adäquaten Kollateralnetzes, andererseits der Prozess der Hibernation sein. Im hibernierenden Myokard, auch als „Winterschlafmyokard“ bezeichnet, wird das Mismatch, das bei Ischämie zwischen Perfusion und Muskelkontraktion vorliegt und zu metabolischen Veränderungen mit Laktatanstieg und Azidose führt, durch Abnahme der Kontraktilität des betroffenen Myokards wieder in ein „Durchblutungs-Kontraktions-Gleichgewicht“ überführt. Hierbei normalisieren sich letztlich der myokardiale ATP-Gehalt und die Azidose wieder. Mit Wiederherstellung der Perfusion kann die Kontraktilität wieder restituieren (Schulz 2003). Dieser Mechanismus gilt als maßgeblich für die oft beobachtete Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach erfolgreicher Revaskularisation im akuten, aber auch im chronischen Stadium der Myokarischämie.

Daten zur Veränderungen der myokardialen Kontraktilität während einer Stammzellinfusion wurden indes bei keiner der klinischen oder experimentellen BMC-Studien erhoben. Im Rahmen dieser Dissertation ging der akute Verschluss des RIVA über 60 Minuten zunächst mit einer sukzessiven Reduktion der Herzfrequenz und des entwickelten linksventrikulären Druckes (dLVP) und folglich auch des rate pressure product (RPP) einher und kann als Ausdruck der abnehmenden myokardialen Kontraktilität infolge der Erschöpfung der myokardialen ATP-Vorräte verstanden werden. Dies war sowohl in der Versuchsreihe *IschämieBMC* als auch in der *KontrolleIschämie*, jedoch - wie erwartet - nicht in der *KontrollePerfusion* nachweisbar. Letztere zeigte aber trotzdem über die Zeit einen stetigen Abfall des RPP, was als ein zunehmender Funktionsverlust infolge Substratmangel zu interpretieren ist und als Charakteristikum der Langendorff'schen Versuchsanordnung verstanden werden kann. In der frühen Reperusionsphase kam es dann in beiden Ischämie-Gruppen, bedingt durch die Vasodilatation im Infarktgefäß mit reaktiver Hyperämie, erneut zu einem Anstieg von Herzfrequenz und folglich des RPP. Interessanterweise blieb dabei dLVP in der *KontrolleIschämie* in dieser Phase relativ konstant, wohingegen in der *IschämieBMC* ein erneuter Anstieg zu sehen war. Dies lässt einen gewissen Anteil von hibernierendem Myokard in der Gruppe *IschämieBMC* vermuten, wohingegen in der *KontrolleIschämie* eine ausgedehntere Nekrose entstanden sein dürfte (eine histologische Aufarbeitung diesbezüglich war aber nicht Gegen-

stand dieser Arbeit). Analog verhielt sich der Koronarfluss (CF). Mit Setzen der Ligatur und somit Ausschalten eines ganzen Perfusionsbereiches fiel CF in beiden Ischämie-Gruppen deutlich ab (*IschämieBMC* -26%, *KontrolleIschämie* -45%) und stieg dann mit Beginn der Reperfusion erneut an. Während der Stammzellinfusion (Zeitpunkt 80') zeigte das RPP in der *IschämieBMC* einen transienten Abfall auf das Niveau zum Ende der Ischämie, was jedoch in erster Linie auf einen Abfall der Herzfrequenz zurückzuführen war. Auch der Koronarfluss sank hier kurzfristig ab. Mit erneutem Anstieg von CF und Herzfrequenz nach Beendigung der Stammzellinfusion normalisierte sich RPP in der *IschämieBMC* wieder und verhielt sich analog zu den Kontrollgruppen.

Fasst man nun die Beobachtungen von RPP, dLVP, HF und CF in der Gruppe *Ischämie-BMC* zusammen, so trat im Zusammenhang mit der Stammzellinfusion eine transiente Reduktion des Koronarflusses auf, was über die Reduktion der Herzfrequenz auch zu einer Abnahme der myokardialen Arbeit, aber nicht der Kontraktilität führte. Dieser Effekt war voll reversibel, da sich die genannten Parameter in der späten Reperfusionsphase analog zu den Kontrollgruppen verhielten. Entsprechend des ohmschen Gesetzes muss in einem druckkonstanten System wie dieser Langendorff-Versuchsanordnung eine Abnahme des Flusses indirekt mit einer Erhöhung des Widerstandes korrelieren. Eine Erhöhung des Widerstandes wäre einerseits durch das Verhalten der infundierten Lösung im Sinne einer nichtnewtonschen Flüssigkeit mit anomaler Viskosität (sei es durch eine hohe Zellzahl, durch Ausbildung von Zellkonglomeraten / Thromben oder die passagere Bindung an endotheliale Oberflächenrezeptoren) oder durch eine Reduktion des Gefäßquerschnittes (durch Vasokonstriktion oder thrombotische Verlegung einzelner Gefäßabschnitte) begründbar. In einer niederländischen Studie an Schafen wurde bei Infusion von mesenchymalen Progenitorzellen (MPC) in Abhängigkeit von Stammzellkonzentration und Infusionsgeschwindigkeit mit Überschreiten einer Grenzkonzentration angiographisch ein zunehmend trägerer Kontrastmittel-Fluss beobachtet. Letztlich konnten aber bei einem Zellfluss von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/min kumulativ bis zu  $50 \times 10^6$  Zellen ohne permanente Beeinträchtigung des Koronarflusses sicher infundiert werden (Houtgraaf et al. 2013). Andere Studien, die weitaus größere Mengen an MSC mit höheren Infusionsraten applizierten (Perin et al. (2008):  $100 \times 10^6$  mit  $1 \times 10^6$  Zellen/min, Hund; Freymann et al. (2006):  $50 \times 10^6$  mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen/min, Schwein), hatten in der Vergangenheit mikrovaskuläre Obstruktionen nachweisen können. Bei Vulliet et al. (2004) waren nach intrakoronarer Zell-Applikation Mikroinfarkte mit signifikanten ST-Streckenveränderungen aufgetreten. Im Rahmen dieser Dissertation wurden im Schnitt  $12,4 \times 10^6$  BMC infundiert (Min.  $5,3 \times 10^6$ , Max.  $26,2 \times 10^6$ ), mit Infusionsraten von 0,5 bis  $2,6 \times 10^6$  Zellen pro Minute. Interessanterweise lässt

sich bei Betrachtung der einzelnen Versuche aber kein direkter Zusammenhang zwischen Anzahl der Stammzellen bzw. Infusionsrate, und somit der Viskosität der infundierten Lösung, und Veränderungen des Koronarflusses sehen. Also müssen hierfür andere, in erster Linie individuelle Faktoren der Tierherzen eine Rolle spielen: zwar führt ischämische Präkonditionierung zur Induktion der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) und somit Steigerung des basalen NO-Spiegels (Muscari et al. 2004), jedoch tritt bei akuter Ischämie - im Rahmen des sogenannten Ischämie/Reperfusionsschadens - vor allem eine endotheliale Dysfunktion auf. So verringert eine durch Ischämie verursachte Gewebsazidose beispielsweise den endothelialen Kalziumeinstrom, was die endotheliale Dysfunktion begünstigt und dort die Synthese vasoaktiver Substanzen, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid, verringert (Asai et al. 2009). Andererseits verstärkt NO in hypoxischen Koronarien (passager) die Vasokonstriktion, da unter Hypoxie die zytosolischen Spiegel des inhibitorischen cIMP, aber nicht die der am klassischen, also relaxierenden Signalweg beteiligten cGMP erhöht werden. Dieser Effekt ist nach Gabe eines NO-Donors reversibel (Chan et al. 2011) und deckt sich mit der in der Klinik gelegentlich nach Rekanalisation zu beobachtenden persistierenden Konstriktion eines Infarktgefäßes, welche nach Gabe von Nitroglycerin reversibel ist (Pfister et al. 1998). Zudem wird durch Ischämie/Reperfusion einerseits mit EDHF ein weiterer potenter Vasodilatator gehemmt und andererseits die Produktion des Vasokonstriktors Endothelin-1 gesteigert (Yang et al. 2016). Weiterhin bewirkt Ischämie am Endothel frühzeitig die Expression und Präsentation von zelladhäsiven Oberflächenmolekülen, v.a. von p-Selektin, was über die vermehrte Anheftung von Zellen potentiell eine Flusswiderstandserhöhung im Gefäß zur Folge haben kann (Eppihimer et al. 1997). Überträgt man nun diese Erkenntnisse auf die Dissertation, so lassen der transiente Charakter der Flussverzögerung/Widerstandserhöhung während der Stammzellinfusion und die Tatsache, dass es keine Korrelation zur Anzahl und Flussrate der infundierten Zellen gab, letztlich in erster Linie funktionelle Vorgänge mit passagerer Vasokonstriktion vermuten. Nichtreversible mechanische Ursachen, wie z.B. thrombotische Gefäßverschlüsse, spielen somit eine untergeordnete Rolle.

Umgelegt auf die klinische Anwendung am Menschen können noch weitere Überlegungen durchgeführt werden: bei einer durchschnittlichen Infusion von  $12,4 \times 10^6$  BMC in diesem Langendorff-Versuch entspricht dies in etwa  $1,8 \times 10^6$  Zellen / g Kaninchenmyokard (Herzgewicht eines 16 Wochen alten Weißen Neuseeländers lt. Herstellerangabe: 6,75g (Charles River 1996)). Ausgehend vom Standardgewicht eines Menschenherzen von 300g (Goldschmid 1926) wurden in den klinischen BMC-Studien (vgl. **Tab 1.2** und **1.3**) im Mittel  $0,38 \times 10^6$  Zellen / g Myokard (max.  $1,39 \times 10^6$  Zellen / g Myokard) und somit eine weitaus geringere relati-

ve Zellzahl verwendet. Wie erwähnt, waren die Zellinfusionen mit diesen Zellzahlen sowohl im Langendorff-Versuch als auch am Menschen sicher. Anders als im klinischen Setting, wo die intrakoronare Zellapplikation in „stop-flow“-Technik erfolgt, fand in dieser Dissertation allerdings keine Okklusion des Infarktgefäßes während der Zellinfusion statt. Es ist vorstellbar, dass höhere relative Zellzahlen bei der "stop-flow"-Technik mit einem höheren Thromboembolierisiko einhergehen, sodass die experimentellen Zahlen nicht direkt auf die gängige klinische Praxis umgelegt werden können. Folgt man allerdings den Ergebnissen von Keith et al. (2015), wonach es im in-vivo Experiment an Schweinen bei der Zellretention keinen Unterschied zwischen "stop-flow" und kontinuierlicher intrakoronarer Zellapplikation gab, bringt diese Technik aber keinen nennenswerten Benefit.

Eine Steigerung der Zellreentionsraten in der Praxis wäre zukünftig durch Erhöhung der applizierten Zellzahl und auch unter kontinuierlichem Koronarfluss denkbar und ausgehend von den hier gewonnenen Daten wohl auch zu einem frühen Zeitpunkt sicher möglich. Zum Beispiel könnte die Stammzellapplikation direkt nach interventioneller Rekanalisation eines Gefäßes durchgeführt werden. Dennoch sind zur Bestimmung der optimalen Zellzahl noch weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und im in vivo-Modell notwendig.

## **4.2. Aktivierung früher Gene im ischämischen Myokard**

Bei der Betrachtung von Homing und Transmigration von Zellen sind die im Myokard während Ischämie und Reperfusion ablaufenden Prozesse ebenfalls von großem Interesse. Akute Ischämie führt auf zellulärer Ebene unter anderem zur Aktivierung von Proteinkinasen wie der Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinasen oder auch der Kaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (Das und Das 2008). In komplexen Interaktionsmustern stellt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren („early genes“) einen Endpunkt der stressinduzierten Signalkaskade dar. Grob vereinfacht werden über den PKC-Weg c-myc und c-fos, über die Tyrosinkinasen c-jun und über die MAPK NF-κB aktiviert. Für NF-κB konnte in zahlreichen Untersuchungen eine signifikante Hochregulation bereits nach kurzer Ischämiedauer gezeigt werden (Li C et al. 2001; Li, Browder, Kao 1999; Xuan et al. 1999, Kupatt et al. 1999; Wang Y et al. 2013). Ähnliche Effekte im Ischämie-Reperfusionsmodell waren auch für c-fos nachweisbar, allerdings war hier die verstärkte Genexpression nur für eine Zeitspanne bis ca. 120 Minuten vorhanden. Eine konsistente Hochregulation von c-myc in diesem Zeitraum war allerdings nicht nachweisbar (Brand et al. 1992, Sharma et al. 1992, Kingma et al. 1999 und

Wechsler et al. 1994), zudem sind die Effekte von c-myc in erster Linie in der Beeinflussung des Zellzyklus zu sehen (Zhong et al. 2006). So konnten beispielsweise Roeske et al (2011) zeigen, dass BMC in Co-Kultur mit Kardiomyozyten zu einer Aktivierung von c-myc, CDK2, CDK4 und ATF-3 führten, wodurch es innerhalb von 24 h zu einer Hochregulation der Beta-rezeptoren kam. Antworten über diese Kaskade würden aber die Zeitdauer der Experimente der hier vorgelegten Dissertation überschreiten, und waren daher nicht nachweisbar.

In der histologischen Auswertung dieser Dissertation konnte eine verstärkte nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B im ischämischen linken Ventrikel nachgewiesen werden - dieser Unterschied zeigte sich im Versuch 1410 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), unter Aussparung von Versuch 1710 (s.u.) lag eine statistische Tendenz vor ( $p = 0,074 < 0,1$ ). In Zusatzuntersuchungen (nicht dargestellt) war indes für c-fos keine verstärkte immunhistochemische Anfärbbarkeit nachweisbar. In Summe deckt sich dies mit o.g. Untersuchungen und bestätigt das Vorhandensein einer relevanten Ischämie in diesem Versuchsaufbau. Interessanterweise war die NF- $\kappa$ B-Translokation im Versuch 1710 invers zu den anderen, d.h. im nicht-ischämischen Myokard war diese gering stärker ausgeprägt als im ischämischen. Wie zuvor erwähnt, fiel Versuch 1710 jedoch bereits vor Beginn der Ischämie mit einer schweren myokardialen Dysfunktion bei globaler Minderperfusion auf.

Die frühe Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Ischämie kann für Homing-Prozesse extrakardialer Zellen bereits in der frühen Reperusionsphase von besonderer Bedeutung sein, immerhin stimuliert es die Expression leukozytenadhäsiver Oberflächenmarker wie ICAM-1, VCAM-1, VEGF und E-Selectin sowie chemotaktischer Substanzen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-12 (Liu und Malik 2006).

#### **4.3. Ist bei unselektiver transkoronarer Applikation eine quantitativ adäquate Retention c-kit-positiver BMC möglich?**

Auch wenn der eigentliche Wirkmechanismus der Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt noch umstritten ist, so scheint es doch eine Assoziation zwischen dem Ausmaß der initialen Zellretention und der späteren Verbesserung der myokardialen Funktion zu geben (Malliaras et al. 2012). Die wenigen publizierten Untersuchungen, die eine exakte Angabe zur Zellretentionsrate vornahmen, geben bei intrakoronarer Applikation myokardiale Retentionsraten von lediglich 2,6% (Hou et al. 2005) bis 4,9% (Keith et al. 2015) an. Bis zu 47% der Zellen fanden sich indes in der Lunge wieder (Hou et al. 2005). In der hier vorgelegten Arbeit lag die

Differenz der BMC zwischen Influat und Effluat im Durchschnitt bei  $9,34 \times 10^6$  Zellen ( $\text{SEM} \pm 3,28 \times 10^6$ ), respektive 73% ( $\text{SEM} \pm 4\%$ ). Diese Zahlen berücksichtigen allerdings nicht die möglicherweise im vorgeschalteten Infusionssystem verbliebenen Zellen (bei Hou et al. (2005) verblieben immerhin  $12 \pm 3\%$  im Injektionssystem). Zudem wurden die Zellen im Effluat nur während der Zellinfusionsphase gezählt, d.h. weitere Auswaschvorgänge in der späteren Reperfusionphase wurden nicht erfasst. Betrachtet man nun isoliert die histologische Wiederfindungsrate c-kit<sup>+</sup> Zellen, so lag in dieser Arbeit die Retentionsrate c-kit<sup>+</sup> Zellen bei 16,3% ( $\text{SEM} \pm 2,1\%$ ) (**Tab 3.3**). Folglich muss auch der extrakardiale Zellverlust der BMC-Gesamtpopulation weitaus höher liegen als die gezählten 27%. Eine akzidentelle Zählung c-kit<sup>+</sup> kardialer Stammzellen sollte aufgrund deren geringerer Zellgröße nicht vorgekommen sein, ist aber nicht gänzlich auszuschließen, spielt aber in der Gesamtbetrachtung bei einem Anteil von einer Zelle pro 10.000 Kardiomyozyten nur eine untergeordnete Rolle. Auch die als Cardiospheres bekannten Zellcluster, die c-kit<sup>+</sup> Zellen enthalten, konnten aufgrund ihrer Größe von 30-150µm (Gallet et al. 2015) sicher identifiziert und ausgeschlossen werden. Die aktuell ermittelten Zellretentionswerte sollten dennoch nicht absolut gesehen werden, da ihnen ein vereinfachendes Rechenmodell zugrundeliegt: Die Gesamtretention wurde ausgehend von den 4 untersuchten Gewebeblöcken unter Bestimmung des jeweiligen Gesamtquerschnittes und der Dicke auf das ganze Herz hochgerechnet, wobei die Gewebeblöcke jeweils apikal der gesetzten Ligatur ausgewählt wurden. Für die weiter basal gelegenen Myokardareale dürfte zum Einen - ein ischämiegetriggertes Homing vorausgesetzt - eine generell geringere Zellretention zugrundeliegen. Zum anderen bestehen die basisnahen Herzanteile zusätzlich aus Klappenebene und Vorhöfen, und das Rechenmodell legt eine vergleichsweise zylinderähnliche Struktur des Herzens zugrunde, sodass das Modell der komplexen Herzform nicht gerecht wird. Ungeachtet dessen, liegt der in dieser Dissertation approximierter Anteil retinierter c-kit<sup>+</sup> Zellen dennoch weitaus höher als der Anteil der heterogenen BMC-Populationen in den anderen o.g. Untersuchungen. Dies könnte als ein Hinweis auf eine besondere Retentionsneigung c-kit<sup>+</sup> BMC interpretiert werden. Eine Rolle hierbei spielt der c-kit-ligand SCF (stem cell factor), welcher als membranständige Form an vielen Zelltypen, so auch Endothelzellen und Kardiomyozyten, und als lösliche Form existiert. Shahzad et al. (2015) untersuchten die Retention von BMC in einem c-kit-knockdown-Infarktmodell an Ratten. Hierbei war eine deutlich geringere Retention von c-kit-knockdown-BMC nachweisbar, was zu der These führte, dass SCF/c-kit-vermittelte Signalkaskaden eine Rolle für die Zellretention spielen. Diese These wurde in einer anderen Arbeit bestätigt, bei der Schweinen ein rekombinantes Adenovirus, das für SCF enkodierte, in das Myokardinfarktareal injiziert wurde. Nach drei



Monaten konnten in der SCF-Gruppe im Infarktareal vermehrt c-kit<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden, zudem zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine signifikante Besserung der LVEF zum Ausgangswert (Ishikawa et al. 2015). Es sei auch generell angemerkt, dass in der Diskussion um die für die kardiale Stammzelltherapie am besten geeignete Zellpopulation in den letzten Jahren v.a. die ebenfalls c-kit-positiven cardiosphere-derived cells (CDC) in den Vordergrund getreten sind (Menasché 2015). Demnach könnte c-kit - auch dieser Dissertation folgend - offenbar als ein wichtiges Zelldifferenzierungsmerkmal für Zellretention/-migration bei myokardialer Regeneration verstanden werden.

Eine prozedurale Besonderheit stellt die im Langendorff-Versuch durchgeführte Koronarperfusion über die in der Aorta ascendens platzierte Kanüle dar, bei der die Tyrodelösung mit-samt der Stammzellsuspension unselektiv in alle Koronarien gelangt (sogenannte retrograde Perfusion, wobei der Fluss selbst in den Koronararterien antegrad erfolgt), und auch während der Stammzellinfusion ein kontinuierlicher Fluss im wiedereröffneten Koronargefäß vorliegt. Letzterer Aspekt ist aber laut der Arbeit von Keith et al. (2015) vernachlässigbar, bei der kein signifikanter Unterschied zwischen der „stop-flow“-Technik und einer kontinuierlichen Koronarperfusion während der Stammzellinfusion gefunden wurde. Die Abwesenheit einer relevanten Aortenklappeninsuffizienz stets vorausgesetzt, kann also mit o.g. Ergebnissen in der Langendorff-Versuchsanordnung eine ausreichend große Anzahl an BMC sicher administriert werden, was zu einer adäquaten Retention c-kit<sup>+</sup> BMC führt.

An dieser Stelle sei jedoch anzumerken, dass die histologische Fixierung der Langendorff-Herzen 60 Minuten nach der BMC-Infusion durchgeführt wurde. Über einen längeren Verbleib der Zellen im Myokard sowie eine Beeinflussung der myokardialen Funktion kann mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden.

#### **4.4. Verteilung der c-kit<sup>+</sup> BMC im ischämischen und nicht-ischämischen Myokard sowie Hinweise auf Extravasation als Ausdruck eines Homing-Verhaltens**

In der vorgelegten Dissertation war nach unselektiver transkoronarer Zellapplikation in der frühen Reperfusionsphase nach Myokardischämie im Vergleich von ischämischem und nicht-ischämischem linken Ventrikel eine dreifach erhöhte Retention c-kit<sup>+</sup> BMC im ischämischen linken Ventrikel nachweisbar, wenngleich das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht wurde ( $p=0,064<0,1$ ; vgl. **Abb 3.7**). Dabei fanden sich im ischämischen Ventrikel mit 69% tenden-

ziell mehr Zellen bereits extravasal wieder ( $p < 0,1$ ). Im nicht-ischämischen linken Ventrikel waren interessanterweise sämtliche c-kit<sup>+</sup> BMC extravasal auffindbar, absolut betrachtet waren dies aber um den Faktor 2,3 weniger als im ischämischen Extravasalraum. Somit lag also eine relevante Mehranreicherung c-kit<sup>+</sup> BMC im ischämischen Extravasalraum vor. Eine mögliche Ursache dafür, dass im nicht-ischämischen linken Ventrikel keine Zellen mehr intravasal nachweisbar waren, könnte ein besserer Abstrom der Tyrodelösung mit Auswaschen der intravasal verbliebenen BMC im nicht-ischämischen Ventrikel sein, da Ischämie an sich mit einem myokardialen Ödem und Mikrozirkulationsstörungen und somit einer geringeren Zellclearance in ischämischen Gewebeabschnitten einhergeht. Auch im rechtsventrikulären Myokard wurden bezogen auf ein Gesichtsfeld ähnlich viele Zellen retiniert wie im ischämischen linken Ventrikel. Da sich aber weder die Myozyten noch die Beschaffenheit des Endothels des rechtsventrikulären wesentlich von denen des linksventrikulären Myokard unterscheiden und keine Ischämie des rechtsventrikulären Myokards angenommen werden dürfte, sind wahrscheinlich weniger Mechanismen auf zellulärer Ebene als vielmehr hämodynamische Aspekte zu vermuten: So weist das rechtsventrikuläre Myokard z.B. eine geringere Kompaktiertheit und eine niedrigere Wandspannung auf als das linksventrikuläre, wodurch per se eine bessere Koronarperfusion und somit ein anteilig höherer Zelldurchsatz des rechtsventrikulären Myokards zu erwarten wäre. Der in diesem Fall aber vergleichsweise geringe Anteil intravasal verbliebener Zellen ließe sich demnach auch damit begründen, dass durch die gute Koronarperfusion eine hohe intravasale Zellclearance vorliegt.

Betrachtet man isoliert den linken Ventrikel, so lag sehr wahrscheinlich ein ischämievermitteltes Homing c-kit<sup>+</sup> BMC vor. Zudem lässt die größere Absolutzahl extravasal wiedergefundener Zellen ein aktives Transmigrationsverhalten vermuten. Der aktive Prozess der Extravasation von Leukozyten ist bereits hinreichend untersucht worden. Auch konnte für Leukozyten bereits eine ischämiegetriggerte transendotheliale Migration aufgezeigt werden (Jaakkola et al. 2000). Die Fähigkeit zur transendothelialen Passage konnte auch für MSC nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2006). Dabei potentiell beteiligte Signalmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und SDF-1 wurden zudem im ischämischen Myokard, sowie die zugehörigen Liganden an MSC und HSC identifiziert (Ip et al. 2007, Wright et al. 2002, Askari et al. 2003, Abbott et al. 2004). Jackson et al. (2001) wiesen in einem Modell an zuvor bestrahlten und mit lacZ-positiven Side-Population-Zellen transplantierten Mäusen eine Migration der lacZ-positiven Zellen in das infarzierte Myokard nach (keine Migration bei sham-operierten Mäusen), d.h. in diesem Fall trugen sogar systemisch zirkulierende Zellen zur myokardialen Regeneration bei. Die Fähigkeit zu solchem Verhalten sollte somit auch für c-

kit<sup>+</sup> BMC angenommen werden können. Ein konkreter Zusammenhang mit SCF kann allerdings nicht gesehen werden, da bisher kein Nachweis existiert, dass SCF bereits in der Akutphase des Myokardinfarktes vermehrt gebildet wird.

Unabhängig von den beteiligten Signalmolekülen sind für aktives Homing letztlich aber auch Zeitpunkt und Art der Zellapplikation von besonderem Interesse. Nahezu alle klinischen Studien zu diesem Thema führten die Stammzelltransplantation frühestens 72h nach Infarkt durch. Sie verwendeten dabei ausschließlich einen intrakoronaren oder intramyokardialen Applikationsweg, vereinzelt erfolgte die Stammzellapplikation auch über einen Sinus-venosus-Katheter (Hou et al. 2005). Die Stammzellen wurden dabei stets gezielt in das Infarktareal eingebracht, sei es über die Katheterisierung der ehemaligen Infarktarterie oder – bei transendokardialer Applikation – durch die Identifizierung des Infarktareales mittels 3D-Mapping-Systemen. Die systemische intravenöse Zelltransplantation hingegen wurde faktisch nie durchgeführt, da sie zumeist mit einem intolerablen Zellverlust einherging: beispielsweise führten Hofmann et al. (2005) 5 bis 10 Tage nach ST-Hebungsinfarkt eine autologe Transplantation von <sup>18</sup>F-FDG-markierten BMC mit anschließender PET-Analyse durch. Hierbei waren 1 Stunde nach intrakoronarer Applikation im ehemaligen Infarktgefäß BMC im Infarktareal nachweisbar, bei intravenöser BMC-Applikation über eine Armvene war dies jedoch nicht der Fall. In letzterem waren die BMC nur in Leber, Milz und Lunge nachweisbar. Wiederum andere Untersuchungen wiesen selbst nach lokaler Zellapplikation einen Großteil der Zellpopulation extrakardial nach, z.B. pulmonal bis zu 47% (Hou et al. 2005).

Könnte daher eventuell eine noch frühere Zellapplikation mit Ischämie als potentiellem Trigger eine stärkere Zellretention bewirken? Mit der Aktivierung früher Gene wie NF-κB oder der Exprimierung von endothelialen Signalmolekülen sind die potentiellen Voraussetzungen für eine gezielte Zellmigration gegeben. Der Nachweis des Homings c-kit<sup>+</sup> BMC in dieser Dissertation unterstützt diese These, insbesondere auch, wenn man bedenkt das die Zellapplikation im Langendorff-Versuch über die retrograde Perfusion quasi semiselektiv erfolgte. Hieraus ergibt sich die weitere Frage, ob in der frühen Postischämiephase vielleicht sogar eine gänzlich unselektive, z.B. intravenöse Zellapplikation möglich wäre. Hierzu verglichen Freyman et al. (2006) die intrakoronare, transendokardiale und intravenöse MSC-Applikation 15 Minuten nach Ischämie. Nach 14 Tagen waren nach i.v.-Gabe keine der radioaktiv markierten MSC im Myokard nachweisbar, wiewohl dies nach intrakoronarer und transendokardialer Gabe möglich war. Allerdings wurde nicht untersucht, ob es innerhalb dieser 14 Tage zu einem passageren Homing von Zellen oder eine dauerhafte Verbesserung

der myokardialen Funktion gekommen war, was aber beides in Hinblick auf die parakrine Hypothese, wonach weniger die dauerhafte Zellansiedelung als vielmehr parakrine Effekte innerhalb der ersten 21 Tage nach Zellapplikation zu einer funktionellen Verbesserung nach 6 Monaten geführt hatten (Malliaras et al. 2012), von Interesse gewesen wäre. Natürlich waren auch im Setting des Langendorff-Versuches weder die Analyse über einen langfristigen Verleib noch der Nachweis dauerhafter Verbesserungen der Myokardfunktion möglich.

#### **4.5. Lässt sich Connexin43 an c-kit<sup>+</sup> BMC nachweisen? Ist ein elektrischer Kontakt zwischen BMC und Myokard nachweisbar? Werden in BMC und in ihrem direkten Umfeld "early genes" aktiviert?**

Ein zentraler Punkt dieser Dissertation war, ob BMC über gap junctions mit ihrer Umgebung kommunizieren könnten, und ob dies einen Einfluss auf das Homingverhalten haben würde. Die erste Voraussetzung hierfür ist die Formierung von (in erster Linie) Connexin43 (Cx43) zu Connexonen. Kardiomyozyten bilden regelhaft gap junctions aus. In den letzten Jahren konnte auch für verschiedene Stammzellformen die Fähigkeit zur Expression von Cx43 nachgewiesen werden. So weisen z.B. MSC bereits in Ruhe geringe Level an Cx43 auf (Wang DG et al. 2014). Bei Co-Kultur von Ratten-Kardiomyozyten und MSC *in vitro* konnten elektrische Kopplungseigenschaften sowie nach 14 Tagen immunhistochemisch Cx43 nachgewiesen werden (Rastan et al. 2004). Auch in einem Infarkt-Mausmodell wiesen c-kit<sup>+</sup> BMC nach 4 Wochen Cx43 auf (Khan et al. 2010). Schmidt et al (2006) konnten in einer Co-Kultur von MSC auf einem endothelialen Monolayer bereits nach 30 Minuten Cx43-Proteine immunhistochemisch nachweisen.

In der vorgelegten Dissertation fanden sich nach Durchmusterung der immunhistologischen Präparate (n=24) mit Identifizierung von 245 c-kit<sup>+</sup> BMC lediglich 4 Zellen (1,6%) positiv für Cx43 im Sinne der Ausbildung von gap junctions. Ein Zusammenhang mit Extravasation respektive Akkumulation im ischämischen Myokard ließ sich dabei nicht finden. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass eine Zell-Zell-Kommunikation über Connexone zwischen BMC und Myokard stattgefunden hat. Letztlich lässt sich dies mit der aktuellen Datenlage aber dennoch in Einklang bringen. So hatten eben Wang und Kollegen (2014) zwar nachweisen können, dass MSC mit erhöhter Cx43-Expression (Nachweis über Western blot) die Angiogenese im ischämischen Herzen zwar fördern, dieser Effekt aber nicht über gap junctions zustande kommt. Auch ließ sich die Ausbildung von gap junctions eher als Diffe-

renzierungsmerkmal der BMC hin zu einem kardialen Phänotyp interpretieren (Shi et al. 2016) und/oder wurde protokollbedingt nicht vor dem siebten Tag nach Zellapplikation nachgewiesen (Rastan et al. 2004, Khan et al. 2010). Andererseits weisen gerade embryonale und induzierte pluriponte Stammzellen eine Expression von Connexinen und gap-junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation auf (Oyamada et al. 2013). Ob dies auch für die in der Zelldifferenzierung reiferen HSC und MSC noch gilt, ist aus der aktuellen Datenlage nicht sicher ableitbar.

Neben diesen Überlegungen zu Homing- bzw. Kommunikationsmechanismen von BMC, die jedoch bereits ein fortgeschrittenes Maß an zellulärer Plastizität voraussetzen, wurde in dieser Dissertation ebenfalls nach Zeichen der Aktivierung früher Gene in BMC gesucht. Mit den eingesetzten Mitteln war jedoch keine gesteigerte nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B oder c-fos in BMC nachweisbar. Im Falle von NF- $\kappa$ B lässt sich das am ehesten damit begründen, dass der verwendete Antikörper gegen die p65-Subunit (RelA) gerichtet ist, wobei diese aber bei hämatopoetischen Zellen wie Leukozyten, anders als die p50-Subunit (c-Rel), kaum eine Rolle bei der frühen Antwort auf Stress spielt (Alcamo et al. 2001). Zudem ist die Immunhistochemie in diesem Gebiet besonders limitiert - die Untersuchungen zu "early genes" wurden mehrheitlich mit Western-Blotting-Techniken durchgeführt, die eine weitaus höhere Sensitivität aufweisen. Diese waren aber im Setting dieser Dissertation nicht anwendbar.

Analog der Tatsache, dass BMC *in vitro* in Kardiomyozyten die Expression von c-myc steigern (Roeske et al. 2011), stellte sich die Frage, ob dies ähnlich auch mit NF- $\kappa$ B möglich wäre oder ob es den Ergebnissen von Rogers et al. (2011) folgend zu einer stammzellvermittelten Downregulation von NF- $\kappa$ B kommen würde. In ergänzenden Untersuchungen konnten in dieser Dissertation jedoch keine Unterschiede in der nukleären Translokation von NF- $\kappa$ B zwischen der direkten Umgebung c-kit-positiver BMC und Vergleichsmyokard gefunden werden. Einschränkend sei jedoch erwähnt, dass die Anzahl der aufgefunden c-kit<sup>+</sup> BMC in der Doppelfärbung mit NF- $\kappa$ B bei lediglich 20 lag, davon 80% im nicht-ischämischen linken Ventrikel, womit eine statistische Beurteilung nicht hinreichend möglich ist. Ohnehin betrug die Kontaktzeit zwischen BMC und (vitalem) Myokard max. 70 Minuten, sodass allein von der zeitlichen Dynamik - anders als bei *in vitro*-Versuchen mit Inkubationszeiten >3 Tagen - eine quantitativ hinreichende nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B wenig wahrscheinlich war.

Zusammenfassend konnten also weder eine gap-junction-vermittelte Kommunikation zwischen BMC und Myokard, noch eine Aktivierung früher Gene am Beispiel von NF- $\kappa$ B in BMC im Rahmen des Homing c-kit<sup>+</sup> BMC nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

### **Auswirkungen einer transkoronaren Applikation autologer Knochenmarkstammzellen auf Hämodynamik und Zellmigration im Ischämie-Reperfusions-Modell am Langendorff-Herzen**

eingereicht von Konrad Vollmer

angefertigt am Herzzentrum Leipzig, Klinik für Herzchirurgie

betreut von:

Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Februar 2017

Die Herzinsuffizienz ist die häufigste Grund zur stationären Behandlung erwachsener Menschen und stellt einen erheblichen gesundheitsökonomischen Faktor dar. Neben seit Jahren etablierten medikamentösen und zunehmend auch interventionellen Therapien haben zusätzlich regenerative Ansätze mit Einsatz adulter Stammzellen in den letzten Jahren größere Aufmerksamkeit erfahren, nachdem Kajstura et al. 1998 erstmals zeigen konnten, dass das Herz kein postmitotisches Organ ist und bei Herzinsuffizienz eine deutlich gesteigerte Proliferation von Kardiomyozyten stattfindet. Zahlreiche klinischen Studien an Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie zeigten in den Folgejahren erfolgversprechende Ergebnisse mit der Transplantation autologer Knochenmarkstammzellen (u.a. Strauer et al. 2002 und 2005, TOPCARE-AMI (Asmuss et al. 2002), BOOST (Wollert et al. 2004)). Die Klärung des optimalen Applikationsweges (transkoronar, intramyokardial, via Patches) und der geeignetsten Stammzell-Subgruppe sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Häufig werden aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen (BMC) verwendet. Als wesentlicher Wirkmechanismus der stammzellvermittelten Regeneration werden zunehmend parakrine Effekte

postuliert, so sezernieren Stammzellen Faktoren, die die Neoangiogenese stimulieren, Fibrosierung hemmen oder zur Differenzierung bestehender Kardiomyozyten beitragen (Menasché 2015; Singh et al. 2016). Ein weiterer Diskussionspunkt ist der optimale Zeitpunkt, sei es nach akuter Ischämie (hierbei zumeist am 3. und 7. Tag nach Myokardinfarkt) oder bei chronischer ischämischer Kardiomyopathie. BMC weisen die Fähigkeit zu transendothelialer Migration auf (Schmidt et al. 2006). Rastan et al. (2005) konnten zudem an BMC die Ausbildung von Connexin43 als Grundlage für eine mögliche gap-junction-vermittelte Kommunikation zwischen BMC und Kardiomyozyten *in vitro* nachweisen. Weiterhin wurde in Zellkultur nachgewiesen, dass BMC in Kardiomyozyten die Synthese des Protoonkogens c-myc induzieren (Roeske et al. 2011).

In der hier vorgelegten Dissertation erfolgte in einem Ischämie-Reperusions-Modell am autonom schlagenden Langendorff-Herzen nach passagerer Ligatur einer Koronarie mit Induktion einer Myokardischämie eine unselektive transkoronare Injektion autologer BMC in der frühen Reperusionsphase. Zu überprüfen war die Hypothese, dass BMC in dieser Phase der Reperfusion sicher administriert werden können und bereits ein ischämiegetriggertes Homing im Infarktareal zeigen. Zudem sollte überprüft werden, ob c-kit<sup>+</sup> BMC in der Lage sind Connexin43 zu exprimieren. Additiv wurde am Beispiel von NF-κB postuliert, dass auch die Aktivierung früher Gene einen Einfluss auf das Homing von c-kit<sup>+</sup> BMC haben.

Für die Durchführung des Langendorff-Versuches wurden n=6 weiße Neuseeländerkaninchen der Fa. Charles River verwendet. Der Aufbau der Langendorff-Apparatur sowie die Überführung des Kaninchenherzens erfolgte nach Dhein (2005). Nach einer Äquilibrationsphase des nun autonom schlagenden Herzens wurde der Ramus interventricularis anterior (RIVA) freigelegt und mittels Fadenligatur für 60 Minuten verschlossen. Parallel wurde aus den langen Röhrenknochen des Kaninchens Knochenmark mit dem scharfen Löffel gewonnen und hieraus BMC mittels Dichtezentrifugation nach Tomita et al. (1999) isoliert. Nach Wiedereröffnung des RIVA erfolgte nun über 10 Minuten die Infusion aller gewonnenen und resuspendierten BMC unselektiv retrograd intrakoronar über die in der proximalen Aorta ascendens platzierten Aortenkanüle. Die Gesamtzahl der BMC wurde sowohl im Inflow als auch im Effluent bestimmt. Nach einer weiteren Reperusionszeit wurden die Herzen fixiert und zur histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet.

Die Applikation einer großen Zellzahl (durchschnittlich  $1,8 \times 10^6$  /g Myokard) mit Infusionsraten von 0,5 bis  $2,6 \times 10^6$  Zellen pro Minute hatte hierbei keinen negativen Einfluss auf Hämodynamik und rhythmogene Stabilität. So zeigte sich zwar während der Zellinfusion eine tran-



siente Reduktion des Koronarflusses und konsekutiv der myokardialen Arbeit, allerdings war dies in der Reperfusionsphase voll reversibel. Dies könnte in erster Linie durch die anomale Viskosität der zellulären Infusionslösung, andererseits durch passagere Vasospasmen oder Zellkonglomerate begründet sein. ST-Streckenveränderungen während des kontinuierlichen Mappings der extrazellulären Potentiale oder ventrikuläre, potentiell ischämiegetriggerte Arrhythmien traten nicht auf, so dass letztlich offenbar keine relevanten Ischämien während der Zellinfusion auftraten. Die Infusion auch größerer Zellmengen, als dies bisher bei Menschen erfolgte, und auch der Zeitpunkt in einer noch sehr frühen Phase nach Ischämie scheinen somit sicher und auch in der klinischen Anwendung prinzipiell möglich. Dennoch sind hier weitere Untersuchungen notwendig.

Mittels tyramidverstärkter Immunfluoreszenz wurden anschließend c-kit<sup>+</sup> BMC im histologischen Präparat identifiziert. Die Retention c-kit<sup>+</sup> BMC lag bei approximiert 16%, womit der gewählte Applikationsweg und -zeitpunkt zu einer adäquaten Zellretention geführt hatten. Weiterhin zeigten die c-kit<sup>+</sup> BMC Zeichen eines "Homing" im ischämischen linksventrikulären Myokard - es waren 3-mal so viele und somit statistisch tendenziell mehr c-kit<sup>+</sup> BMC im ischämischen als im nicht-ischämischen linken Ventrikel nachweisbar. Der Anteil der bereits extravasal auffindbaren Zellen war in der Ischämiezone 2,3-fach erhöht. Somit ergeben sich auch Anhalte für eine ischämiegetriggerte Extravasation.

Die mikroskopische Durchmusterung zeigte indes keine signifikante Expression von Connexin43 an c-kit<sup>+</sup> BMC. Somit kann eine gap-junction-vermittelte Kommunikation zwischen c-kit<sup>+</sup> BMC und Myokardzellen im Rahmen des Homings und der Extravasation c-kit<sup>+</sup> BMC nicht bestätigt werden, wenngleich die in Co-Kulturen mit Kardiomyozyten nachgewiesene Expression von Connexin43 an BMC (Rastan et al. 2005) zu einem späteren Zeitpunkt, als dies im Rahmen dieses Untersuchungsaufbaus möglich war, nicht auszuschließen ist.

Eine ischämievermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Kardiomyozyten wurde durch Nachweis einer verstärkten, jedoch statistisch nicht-signifikanten nukleären Translokation gezeigt. Im direkten Umfeld c-kit<sup>+</sup> BMC fand sich in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B kein Unterschied zu Vergleichsarealen, auch war in den BMC selbst keine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachweisbar. Somit sind NF- $\kappa$ B-vermittelte Signalwege, wenngleich weiterhin denkbar, offenbar nicht entscheidend für das Homing c-kit<sup>+</sup> BMC.

## 6. Literaturverzeichnis

Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ; 2004; Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury; *Circulation*. 2004 Nov 23; 110(21):3300-5

Abraham WT, Smith S; 2013; Devices in the management of advanced, chronic heart failure; *Nat Rev Cardiol*. 2013 February; 10(2): 98–110

Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Léobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagège A, Samuel JL, Menasché P; 2004; Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium; *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jul 21;44(2):458-63

Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, Bronson R, Beg AA, Scott M, Doerschuk CM, Hynes RO, Baltimore D; 2001; Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF-kappa B in leukocyte recruitment; *J Immunol*. 2001 Aug 1;167(3):1592-600

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM.; 1999; Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization; *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221-8

Asai M, Takeuchi K, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Satoh H, Hayashi H, Watanabe H; 2009; Extracellular acidosis suppresses endothelial function by inhibiting store-operated Ca<sup>2+</sup> entry via non-selective cation channels; *Cardiovasc Res*. 2009 Jul 1;83(1):97-105

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS; 2003; Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy; *Lancet*. 2003 Aug 30; 362(9385):697-703

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM; 2002; Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI); Circulation. 2002 Dec 10;106(24):3009-17

Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; 2006; Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction; N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1222-32

Baeuerle PA, Baltimore D; 1996; NF-kappaB: 10 years after.; Cell. 1996 Oct 4;87(1):13-20

Baldwin AS Jr.; 1996; The NF-kappaB and I-KappaB proteins: new discoveries and insights.; Annu Rev Immunol. 1996;14:649-83

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC; 2004; Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium; Nature. 2004 Apr 8; 428 (6983): 668-73

Balsam LB, Robbins RC; 2005; Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart; Clinical Science (2005) 109, 483–492 (Printed in Great Britain)

Beltrami A P, Urbanek K, Kajstura J et al.; 2001; Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction; N Engl J Med. 344, 1750–1757

Boenisch T, Henne C; 2003; Handbuch immunchemische Färbemethoden, 3. Ausgabe; DakoCytomation GmbH (Hamburg) 2003

Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P; 2011; Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardio-myopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial; Lancet. 2011 Nov 26; 378(9806):1847-57

Brand T, Sharma HS, Fleischmann KE, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W; 1992; Proto-oncogene Expression in Porcine Myocardium Subjected to Ischemia an Reperfusion; *Circulation Research* 1992;71:1351-1360

Brunskill SJ, Hyde CJ, Doree CJ, Watt SM, Martin-Rendon E; 2009; Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bone-marrow-derived cell therapy for ischaemic heart disease; *Eur J Heart Fail.* 2009 Sep;11(9):887-96

Burck HC; 1988; *Histologische Technik: Leifaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate für Unterricht und Praxis*, 6. Auflage; Thieme, Stuttgart, 6. unveränderte Auflage, 1988

Caplan AI, Dennis JE; 2006; Mesenchymal stem cells as trophic mediators; *J. Cell Biochem.*, 98 (2006), pp. 1076–1084

Chan CK, Mak J, Gao Y, Man RY, Vanhoutte PM; 2011; Endothelium-derived NO, but not cyclic GMP, is required for hypoxic augmentation in isolated porcine coronary arteries *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Dec;301(6):H2313-21

CHARLES RIVER WIGA GMBH (1996); 1996; Informationsbroschüre zu den Laborkaninchen; Labortierzüchter, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP; 2004; Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction; *Am J Cardiol.* 2004 Jul 1; 94(1):92-5

Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E,

Cossu G; 2001; Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10733-8

Das M, Das DK; 2008; Molecular mechanism of preconditioning; IUBMB Life. 2008 Apr;60(4):199-203

Dhein S; 1992; Das proarrhythmische Risiko von Antiarrhythmika. Eine *in-vitro* Studie; Med. Habil.-Schr. Universität Köln 1992

Dhein S; 2005; in: Dhein S, Delmar M, Mohr FW (Hrsg.): Practical Methods in cardiovascular research, 1. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005, S. 155-172

Dhein S, Garbade J, Rouabah D, Abraham G, Ungemach FR, Schneider K, Ullmann C, Aupperle H, Gummer JF, Mohr FW; 2006; Effects of autologous bone marrow stem cell transplantation on beta-adrenoceptor density and electrical activation pattern in a rabbit model of non-ischemic heart failure; J Cardiothorac Surg. 2006; 1: 17

Dimmeler S, Zeiher AM ; 2009; Cell Therapy of Acute Myocardial Infarction: Open Questions; Cardiology 2009;113:155–160

Du Q, Jiang L, Wang X, Wang M, She F, Chen Y; 2014; Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the lymphangiogenesis of gallbladder carcinoma through nuclear factor-kappa B-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor-C; Cancer Sci. 2014 Oct;105(10):1261-71

Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Epstein CJ, Laroux S, Granger DN; 1997; Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature; Am J Physiol. 1997 Dec;273(6 Pt 1):G1326-32

Fisher SA, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E; 2015; Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure; Circ Res. 2015 Apr 10;116(8)

Fisher SA, Zhang H, Doree C, Mathur A, Martin-Rendon E; 2015; Stem cell treatment for acute myocardial infarction; Cochrane Database Syst Rev. 2015 Sep 30;9:CD006536

Freyman T1, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL; 2006; A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction; *Eur Heart J.* 2006 May;27(9):1114-22

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN; 1976; Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs; *Exp. Hematol.* 4, 267-274

Gallet R, Tseliou E, Dawkins J, Middleton R, Valle J, Angert D, Reich H, Luthringer D, Kreke M, Smith R, Marbán L, Marbán E; 2015; Intracoronary delivery of self-assembling heart-derived microtissues (cardiospheres) for prevention of adverse remodeling in a pig model of convalescent myocardial infarction; *Circ Cardiovasc Interv.* 2015; 8: e002391

Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, Fan B, Liu X, Zhang S, Sun A, Zou Y; 2006; Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI); *Heart* 2006;92:1764–1767

Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS; 2006; Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement; *FASEB J.*, 20 (2006), pp. 661–669

Goldschmid E; 1926; Kapitel "Größe und Gewicht des Herzens unter normalen und pathologischen Verhältnissen" aus *Blutzirkulation* (Hrsg. L. Asher); Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg

Gossen M, Kaufmann J, Triezenberg SJ; 2004; *Transcription factors*; Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg 2004

Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S, Agbulut O, Menasché P; 2011; Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison; *Ann Thorac Surg.* 2009 Apr;87(4):1196-203

Harvey E, Fisher SA, Doree C, Taggart DP, Martin-Rendon E.; 2015; Current evidence of the efficacy of cell-based therapies in heart failure; *Circ J.* 2015;79(2):229-36

Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, Schuetz T, Dichtl W, Velik-Salchner C, Stein JJ, Penninger JM; 2016; Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction; *Circ Res.* 2016 Jan 22;118(2):216-21

Heusch G (Hrsg); 1990; Pathophysiologie und rationale Pharmakotherapie der Myokardischämie, 1. Auflage; Steinkopff-Verlag, Darmstadt. 1990

Hocht-Zeisenberg, E., Kahnert, H., Guan, K. et al.; 2004; Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation; *Eur. Heart J.* 25, 749–758

Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H; 2005; Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium; *Circulation.* 2005 May 3;111(17):2198-202

Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG, March KL; 2005; Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials; *Circulation.* 2005; 112: I-150-I-156

Houtgraaf JH, de Jong R, Kazemi K, de Groot D, van der Spoel TI, Arslan F, Hoefer I, Pasterkamp G, Itescu S, Zijlstra F, Geleijnse ML, Serruys PW, Duckers HJ; 2013; Intracoronary infusion of allogeneic mesenchymal precursor cells directly after experimental acute myocardial infarction reduces infarct size, abrogates adverse remodeling, and improves cardiac function; *Circ Res.* 2013 Jul 5;113(2):153-66

Hu S, Liu S, Zheng Z, Yuan X, Li L, Lu M, Shen R, Duan F, Zhang X, Li J, Liu X, Song Y, Wang W, Zhao S, He Z, Zhang H, Yang K, Feng W, Wang X; 2011; Isolated coronary artery bypass graft combined with bone marrow mononuclear cells delivered through a graft vessel for patients with previous myocardial infarction and chronic heart failure: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial; *J Am Coll Cardiol.* 2011 Jun 14;57(24):2409-15

Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ.; 2007; Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment; *Mol Biol Cell*. 2007 Aug;18(8):2873-82

Ishikawa K, Fish K, Agüero J, Yaniz-Galende E, Jeong D, Kho C, Tilemann L, Fish L, Liang L, Eltoukhy AA, Anderson DG, Zsebo K, Costa KD, Hajjar RJ; 2015; Stem cell factor gene transfer improves cardiac function after myocardial infarction in swine; *Circ Heart Fail*. 2015 Jan;8(1):167-74

Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P, Prockop DJ; 2007; Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment; *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 16;354(3):700-6

Jaakkola K, Jalkanen S, Kaunismäki K, Vääntinen E, Saukko P, Alanen K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Salmi M; 2000; Vascular adhesion protein-1, intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin mediate leukocyte binding to ischemic heart in humans; *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jul;36(1):122-9

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA; 2001; Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells; *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(11):1395-402

Jankowska EA, von Haehling S, Czarny A, Zaczynska E, Kus A, Anker SD, Banasiak W, Ponikowski P; 2005; Activation of the NF-kappa B system in peripheral blood leukocytes from patients with chronic heart failure; *Eur J Heart Fail*. 2005 Oct;7(6):984-90

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F; 2006; Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial; *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):113-21



Kacimi R, Karliner JS, Koudssi F, Long CS; 1998; Expression and Regulation of Adhesion Molecules in Cardiac Cells by Cytokines; *Circ Res.* 1998 Mar 23;82(5):576-86

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P; 1998; Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8801-5

Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, Pham S, Symes J, Zambrano JP, Fishman J, Pattany P, McNiece I, Conte J, Schulman S, Wu K, Shah A, Breton E, Davis-Sproul J, Schwarz R, Feigenbaum G, Mushtaq M, Suncion VY, Lardo AC, Borrello I, Mendizabal A, Karas TZ, Byrnes J, Lowery M, Heldman AW, Hare JM; 2014; Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial; *Circ Res.* 2014 Apr 11; 114(8):1302-10

Keith MC, Tokita Y, Tang XL, Ghafghazi S, Moore JB 4th, Hong KU, Elmore JB, Amraotkar AR, Guo H, Ganzel BL, Grubb KJ, Flaherty MP, Vajravelu BN, Wysoczynski M, Bolli R; 2015; Effect of the stop-flow technique on cardiac retention of c-kit positive human cardiac stem cells after intracoronary infusion in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy; *Basic Res Cardiol.* 2015 Sep;110(5):503

Khan M, Mohsin S, Khan S, Riazuddin S; 2010; Lin-c-kit(+) BM-derived stem cells repair Infarcted Heart; *J Stem Cells Regen Med.* 2010 Apr 5;6(1):15-25. eCollection 2010

Kingma JG Jr; 1999; Cardiac adaptation to ischemia-reperfusion injury; *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;874:83-99

Kumar NM, Gilula NB; 1996; The gap junction communication channel; *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):381-8

Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF; 1999; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Contributes to Ischemia- and Reperfusion-Induced Endothelial Activation in Isolated Hearts; *Circ Res.* 1999 Mar 5;84(4):392-400

Laflamme, M. A., Myerson, D., Saffitz, J. E. and Murry CE; 2002; Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts; *Circ. Res.* 90, 634–640

Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK; 2010; Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury; *Stem Cell Res.* 2010 May;4(3):214-22

Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA; 2001; Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation; *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1291-7

Li C, Kao RL, Ha T, Kelley J, Browder IW, Williams DL; 2001; Early activation of IKK $\beta$  during in vivo myocardial ischemia; *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 280: H1264-H1271, 2001

Li C, Browder W, Kao RL; 1999; Early activation of transcription factor NF-kappa B during ischemia in perfused rat heart; *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 2):H543-52

Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA; 1999; smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function; *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Mar;31(3):513-22

Liang CJ, Lee CW, Sung HC, Chen YH, Wang SH, Wu PJ, Chiang YC, Tsai JS, Wu CC, Li CY, Chen YL; 2014; Magnolol reduced TNF- $\alpha$ -induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via JNK/p38 and NF- $\kappa$ B signaling pathways; *Am J Chin Med.* 2014;42(3):619-37

Liu SF, Malik AB; 2006; NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L622–L645, 2006;

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K; 2006; Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction; N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1199-209

Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, Galang G, Zhang Y, Schoenhoff F, Van Eyk J, Marbán L, Marbán E; 2012; Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells; Circulation. 2012 Jan 3;125(1):100-12

Marangiu E, Crisafulli A; 2014; Cardioprotection Acquired Through Exercise: The Role of Ischemic Preconditioning; Current Cardiology Reviews, 2014, 10, 336-348

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; ESC Committee for Practice Guidelines; 2012; ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC; European Heart Journal (2012) 33, 1787–1847

Menasché P; 2015; Stem cells for the treatment of heart failure; Phil. Trans. R. Soc. B 370: 20140373

Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T; 1997; In vivo transcription of *cis* element "decoy" against nuclear factor kappa B binding site prevents myocardial infarction; Nat Med. 1997 Aug;3(8):894-9

Mulisch M, Welsch U; 2010; Romeis - Mikroskopische Technik, 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Muscari C, Bonafe' F, Gamberini C, Giordano E, Tantini B, Fattori M, Guarnieri C, Caldarera CM; 2004; Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart; *Life Sci.* 2004 Jan 16;74(9):1127-37

Nelson R, Gobel F, Joprgensen C, Wang K, Wang Y, Taylor H; 1974; Hemodynamic Predictors of Myocardial Oxygen Consumption During Static and Dynamic Exercise; *Circulation.* 1974;50:1179-1189

Norol F, Bonnet N, Peinnequin A, Chretien F, Legrand R, Isnard R, Herodin F, Baillou C, Delache B, Negre D, Klatzmann D, Vernant JP, Lemoine FM; 2007; GFP-transduced CD34+ and Lin-CD34- hematopoietic stem cells did not adopt a cardiac phenotype in a nonhuman primate model of myocardial infarct; *Exp Hematol* 2007; 35: 653-661

Nygren, JM, Jovinge S, Breitbach M et al.; 2004; Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.; *Nat. Med.* 10, 494–501

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P; 2001; Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium; *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P; 2001; Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10344-9

Oskouei BN et al.; 2012; Increased potency of cardiac stem cells compared with bone marrow mesenchymal stem cells in cardiac repair; *Stem Cells Transl. Med.* 1, 116–124

Oyamada M, Takebe K, Endo A, Hara S, Oyamada Y; 2013; Connexin expression and gap-junctional intercellular communication in ES cells and iPS cells; *Front Pharmacol.* 2013 Jul 3;4:85

Perin EC, Silva GV, Henry TD, Cabreira-Hansen MG, Moore WH, Coulter SA, Herlihy JP, Fernandes MR, Cheong BY, Flamm SD, Traverse JH, Zheng Y, Smith D, Shaw S, Westbrook L, Olson R, Patel D, Gahremanpour A, Canales J, Vaughn WK, Willerson JT; 2011; A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF)

Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, Litovsky S, Lin J, Vaughn WK, Coulter S, Fernandes MR, Willerson JT; 2008; Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction; *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Mar;44(3):486-95

Pfister M, Seiler C, Fleisch M, Göbel H, Lüscher T, Meier B; 1998; Nitrate induced coronary vasodilatation: differential effects of sublingual application by capsule or spray; *Heart.* 1998 Oct; 80(4): 365–369

Piepoli MF, Vallisa D, Arbasi M, Cavanna L, Cerri L, Mori M, Passerini F, Tommasi L, Rossi A, Capucci A; Cardiac StudyGroup; 2010; Bone marrow cell transplantation improves cardiac, autonomic, and functional indexes in acute anterior myocardial infarction patients (Cardiac Study); *Eur J Heart Fail.* 2010 Feb;12(2):172-80

Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P. et al.; 2002; Chimerism of the transplanted heart; *N Engl J Med.* 346, 5-15

Rastan AJ, Walther T, Kostelka M, Garbade J, Schubert A, Stein A, Dhein S, Mohr FW; 2005; Morphological, electrophysiological and coupling characteristics of bone marrow-derived mononuclear cells - an in vitro model; *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Jan;27(1):104-10

Roeske F, Stein A, Salameh A, Rastan AJ, Ziegelhoeffer B, Garbade J, Misfeld M, Kostelka M, Mohr FW, Dhein S; 2011; Activation of Cardiomyocytes Depending on Their Proximity to Human Bone Marrow Stem Cells; *Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 59: 78–84

Rogers TB, Pati S, Gaa S, Riley D, Khakoo AY, Patel S, Wardlow RD 2nd, Frederick CA, Hall G, He LP, Lederer WJ ; 2011; Mesenchymal stem cells stimulate protective genetic reprogramming of injured cardiac ventricular myocytes; *J Mol Cell Cardiol.* 2011 Feb;50(2):346-56

Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, Le Tourneau T, Agostini D, Gaxotte V, Sportouch C, Galinier M, Crochet D, Teiger E, Richard MJ, Polge AS, Beregi JP, Manrique A, Carrie D, Susen S, Klein B, Parini A, Lamirault G, Croisille P, Rouard H, Bourin P, Nguyen JM, Delasalle B, Vanzetto G, Van Belle E, Lemarchand P; 2011; Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial; *Eur Heart J.* 2011 Jul;32(14):1748-57

Rose RA, Jiang H, Wang X, Helke S, Tsoporis JN, Gong N, Keating SC, Parker TG, Backx PH, Keating A; 2008; Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro; *Stem Cells.* 2008;26:2884–2892

Roskamm H, Neumann FJ, Kalusche D, Bestehorn HP; 2004; *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*, 5. Auflage; Springer-Verlag 2004

Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, Iaffaldano G, Padin-Iruegas ME, Gonzalez A, Rizzi R, Small N, Muraski J, Alvarez R, Chen X, Urbanek K, Bolli R, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P; 2007; Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo; *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 6;104(45):17783-8

Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM; 2004; Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial; *J Am Coll Cardiol.* 2004 Oct 19;44(8):1690-9

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators; 2006; Intracoronary Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction ; N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1210-21

Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R; 1967; Development of collateral circulation in the pig and the dog heart; *Cardiologia* (1967), 51:321-335

Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinköthe T, Klinz FJ, Schwinger RH, Mehlhorn U, Bloch W; 2006; Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier; *Eur J Cell Biol.* 2006 Nov;85(11):1179-88. Epub 2006 Jul 5

Schulz R; 2003; Herzmuskel im Winterschlaf; *Essener Unikate* 20/2003, S. 8-17

Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itescu S; 2004; Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration; *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Aug;287(2):H525-32

Sen R and Baltimore D; 1986; Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences; *Cell* 46: 705–716, 1986

Shahzad U, Li G, Zhang Y, Li RK, Rao V, Yau TM; 2015; Transmyocardial Revascularization Enhances Bone Marrow Stem Cell Engraftment in Infarcted Hearts Through SCF-C-kit and SDF-1-CXCR4 Signaling Axes; *Stem Cell Rev.* 2015 Apr;11(2):332-46

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ.; 2002; Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects; *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25

Sharma HS, Wunsch M, Brand T, Verdouw PD, Schaper W; 1992; Molecular biology of the coronary vascular and myocardial responses to ischemia; *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20 Suppl 1:S23-31

Shi SR, Key ME, Kalra KL; 1991; Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections; J Histotech Cytochem 1991; 39(6): 741-748.

Shi S, Wu X, Wang X, Hao W, Miao H, Zhen L, Nie S; 2016; Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocyte-Like Cells Is Regulated by the Combined Low Dose Treatment of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and 5-Azacytidine; Stem Cells Int. 2016; 2016: 3816256

Siegel G, Krause P, Wöhrle S, Nowak P, Ayturan M, Kluba T, Brehm BR, Neumeister B, Köhler D, Rosenberger P, Just L, Northoff H, Schäfer R.; 2012; Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential; Stem Cells Dev. 2012 Sep 1;21(13):2457-70

Singh Aa, Singh Ab, Sen D; 2016; Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015); Stem Cell Research & Therapy (2016) 7:82

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kögler G, Wernet P, Müller HW, Köstering M; 2005; Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study; J Am Coll Cardiol. 2005 Nov 1;46(9):1651-8

Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM; 2010; The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heARt failure: the STAR-heart study; Eur J Heart Fail. 2010 Jul;12(7):721-9

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P; 2002; Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans; Circulation. 2002 Oct 8;106(15):1913-8

Strauer BE, Steinhoff G; 2011; 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart; J Am Coll Cardiol 2011;58:1095-104



Sürder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, Turchetto L, Radrizzani M, Astori G, Schwitter J, Erne P, Zuber M, Auf der Maur C, Jamshidi P, Gaemperli O, Windecker S, Moschovitis A, Wahl A, Bühler I, Wyss C, Kozerke S, Landmesser U, Lüscher TF, Corti R; 2013; Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function; *Circulation*. 2013 May 14;127(19):1968-79

Suurmeijer AJ; 1994; Optimizing immunohistochemistry in diagnostic tumor pathology with antigen retrieval; *Eur J Morphol*. 1994 Aug;32(2-4 Suppl):325-30

Tendera M, Wojakowski W, Rużyłło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ; 2009; Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial; *Eur Heart J*. 2009 Jun;30(11):1313-21

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD; 2002; Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart; *Circulation*. 2002 Jan 1; 105(1):93-8

Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ; 1999; Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function; *Circulation* 100 (19 Suppl): II247–56

Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRn).; 2012; Effect of

the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial; JAMA. 2012 Dec 12;308(22):2380-9

Tribouilloy C, Rusinaru D, Mahjoub H, Soulière V, Lévy F, Peltier M, Slama M, Massy Z; 2008; Prognosis of heart failure with preserved ejection fraction: a 5 year prospective population-based study.; Eur Heart J. 2008 Feb;29(3):339-47

Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S; 2005; Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells; J Mol Cell Cardiol. 2005 Nov;39(5):733-42. Epub 2005 Sep 29

Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD.; 2004; Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs.; Lancet. 2004 Mar 6; 363(9411): 783-4.

Wang CM, Guo Z1, Xie YJ1, Hao YY2, Sun JM3, Gu J4, Wang AL1.; 2014; Co-treating mesenchymal stem cells with IL 1beta and TNF-alpha increases VCAM-1 expression and improves post-ischemic myocardial function; Mol Med Rep. 2014 Aug;10(2):792-8

Wang DG, Zhang FX, Chen ML, Zhu HJ, Yang B, Cao KJ; 2014; Cx43 in mesenchymal stem cells promotes angiogenesis of the infarcted heart independent of gap junctions; Mol Med Rep. 2014 Apr; 9(4):1095-102

Wang Y, Suo F, Liu J, Hu H, Xue M, Cheng W, Xuan Y, Yan S; 2013; Myocardial infarction induces sympathetic hyperinnervation via a nuclear factor-kappa B-dependent pathway in rabbit hearts; Neurosci Lett. 2013 Feb 22;535:128-33

Wechsler AS, Entwistle JW, Ding M, Yeh M, Jakoi ER; 1994; Myocardial stunning: Association with Altered Gene Expression; J Card Surg 1994;9[Suppl]:537-542

Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H; 2000; Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry; Am J Surg Pathol. 2000 Jul;24(7):1016-9

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H; 2004; Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial; Lancet. 2004 Jul 10-16;364(9429):141-8

Wong RC, Pera MF, Pébay A; 2008; Role of gap junctions in embryonic and somatic stem cells; Stem Cell Rev. 2008 Dec;4(4):283-92

Wong CW, Christen T, Kwak BR; 2004; Connexin in leukocytes: shuttling messages?; Cardiovasc Res. 2004 May 1;62(2):357-67

Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL; 2002; Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines; J Exp Med. 2002 May 6; 195(9):1145-54

Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y; 2004; Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*.; Exp Biol Med (Maywood). 2004 Jul;229(7):623-31

Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RC, Han H, Qiu Y, Li JJ, Bolli R; 1999; Nuclear Factor-kappa B Plays an Essential Role in the Late Phase of Ischemic Preconditioning in Conscious Rabbits; Circ Res. 1999 May 14;84(9):1095-109

Yousef M, Schannwell CM, Köstering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE; 2009; The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction; J Am Coll Cardiol. 2009 Jun 16;53(24):2262-9

Zeng M, Wei X, Wu Z, Li W, Li B, Zhen Y, Chen J, Wang P, Fei Y.; 2013; NF-kappa B-mediated induction of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury; Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jun 28;436(2):180-5

Zhong W, Mao S, Tobis S, Angelis E, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, de Alborán IM, MacLellan WR; 2006; Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway; EMBO J. 2006 Aug 23;25(16):3869-79

Zugck C; 2013; Versorgungsrealität in Deutschland: Wird die Herzfrequenz bei chronischer systolischer Herzinsuffizienz ausreichend gesenkt?; Presstext DGK 04/2013

## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und ehemaligen Leiter des kardiochirurgischen Forschungslabors des Herzzentrums Leipzig Herrn Prof. Dr. med. Stefan Dhein bedanken, der mir zum einen dieses interessante Thema zur Verfügung stellte und zum anderen durch seine Anregungen und Unterstützung einen großen Anteil an der Fertigstellung dieser Promotion hat. Seine fachliche Präsenz sowie sein auch nach Jahren noch ungebrochenes Interesse am Gelingen dieser Arbeit sind längst nicht selbstverständlich.

Ebenso danke ich Prof. Dr. med. Jens Garbade für die Übernahme der Co-Betreuerschaft am Herzzentrum Leipzig.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ardawan Rastan bedanken, der mich in so manches Laborprotokoll einweihte und wissenschaftliche Gedanken mit mir austauschte.

Beim Leiter der Klinik für Herzchirurgie des Herzzentrums Leipzig Prof. Dr. med. Friedrich-Wilhelm Mohr möchte ich mich ebenfalls bedanken, da erst er mir mit den Mitteln seines Forschungslabors die Anfertigung dieser Promotion ermöglichte.

Mein Dank gilt auch den Labormitarbeitern und anderen Doktoranden, mit denen ich die langen Stunden im Labor teilen durfte.

Meinen Eltern danke ich vor allem für all das, was sie mir für das Leben mitgegeben haben.

Der größte Dank gebührt aber meiner Ehefrau, die mir nicht nur mit fachlichem Rat zur Seite gestanden, sondern auch mit ihrer Energie und Liebe während meiner Stunden und Tage der "wissenschaftlichen Askese" das Leben in unserem Hause aufrecht erhalten hat.

## Lebenslauf

in Online-Publikation nicht verfügbar

## Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift